



MAIARA MARX LUZ FIUSA

QUEBRA DA BARREIRA ENDOTELIAL NO CHOQUE SÉPTICO:
CARACTERIZAÇÃO, MECANISMOS E NOVOS MEDIADORES

*“ENDOTHELIAL BARRIER BREAKDOWN IN SEPTIC SHOCK:
CHARACTERIZATION, MECHANISMS AND NEW MEDIATORS”*

Campinas

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

MAIARA MARX LUZ FIUSA

QUEBRA DA BARREIRA ENDOTELIAL NO CHOQUE SÉPTICO:
CARACTERIZAÇÃO, MECANISMOS E NOVOS MEDIADORES

*“ENDOTHELIAL BARRIER BREAKDOWN IN SEPTIC SHOCK:
CHARACTERIZATION, MECHANISMS AND NEW MEDIATORS”*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Doutora em Ciências, área de concentração Patologia Clínica.

Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Medical Sciences, with focus in Clinical Pathology.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO

FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA

ALUNA MAIARA MARX LUZ FIUSA E ORIENTADA PELO

PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA

Campinas

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/00984-3; CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

F586q Fiusa, Maiara Marx Luz, 1987-
Quebra da barreira endotelial no choque séptico : caracterização, mecanismos e novos mediadores / Maiara Marx Luz Fiusa. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Erich Vinicius de Paula.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Choque séptico. 2. Células endoteliais. 3. Junções aderentes. 4. Caderinas. I. Paula, Erich Vinicius de, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Endothelial barrier breakdown in septic shock : characterization, mechanisms and new mediators

Palavras-chave em inglês:

Shock, Septic
Endothelial cells
Adherens junctions
Cadherins

Área de concentração: Patologia Clínica

Titulação: Doutora em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Erich Vinicius de Paula [Orientador]
Rodrigo Bueno de Oliveira
José Antônio Rocha Gontijo
Reinaldo Salomão

Thereza Christina Barja Fidalgo

Data de defesa: 28-07-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MAIARA MARX LUZ FIUSA

ORIENTADOR: ERICH VINICIUS DE PAULA

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. ERICH VINÍCIUS DE PAULA**
- 2. PROF. DR. RODRIGO BUENO DE OLIVEIRA**
- 3. PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO ROCHA GONTIJO**
- 4. PROF. DR. REINALDO SALOMÃO**
- 5. PROF^a. DR^a. THEREZA CHRISTINA BARJA FIDALGO**

Programa de Pós-Graduação em Ciência Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA [28/07/2017]

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai,
meu marido e minha família

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao meu pai pela companhia, bons conselhos, ajuda, paciência e cumplicidade durante todos os anos de minha vida e principalmente nessa caminhada árdua, sofrida, onde tivemos de enfrentar muitos obstáculos.

Agradeço infinitamente *in memoriam* a minha querida avó Dona Célia a todo cuidado dedicado, apoio e amor a mim dedicados durante toda sua vida, a todo santo domingo o seu “vá com Deus, manda abraço pro Erich”, o fim de meu doutorado nunca foi o mesmo sem suas palavras. Agradeço a minha amada mãe que infelizmente não teve a oportunidade de me ver alcançar esse tão sonhado doutorado, mas tenho certeza que sempre esteve comigo em todos os momentos e conquistas de minha vida desde minha primeira formatura na pré escola, tenho certeza que estão lá em cima cuidando e olhando por mim.

Agradeço também à minha família, em especial a minha Tia Marisa e minha prima-irmã Victória que estiveram continuamente ao meu lado me apoiando sempre que necessário.

Aos meus amigos de laboratório Vanessa, Aline Barnabé, Mari, Bruna, Kiara e Stephany, os quais me ajudaram muito na confecção deste trabalho e de muitos outros que já passaram.

A todos os funcionários do Laboratório de Hemostasia, que me ajudaram com as pesquisas e sanaram muitas dúvidas, em especial Silmara, Tânia, Ricardo, Cristina, Zelo, Helder, Priscila, Sandra e Devanira. Agradeço ao Laboratório de Terapia Gênica, em especial a Carolina Lanaro e Ucha, pelos ensinamentos e proveitosas discussões. Agradeço também ao laboratório de hemoglobinopatias, em especial a Carla. A Dr Mariana Lazarini meu agradecimento especial por todo empenho, ajuda, discussões e ensinamentos.

A todos os alunos e funcionários do Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa/Universidad Autonoma de Madrid, em especial ao Dr. Jaime Millan, Diego e Suzana por me receberem muito bem, por todo ensinamento, paciência e por essa rica colaboração.

Agradeço meus mais que amigos, àqueles que se tornaram minha família e levarei por toda vida, Yzabella, Fábio, Loredana, Will, Gleice e Luis Fernando, pela companhia, conselhos e ouvidos em todas as horas em que precisei!

Em especial agradeço essa pessoa maravilhosa, meu companheiro de vida, meu parceiro, com sua infinita paciência e amor, meu marido Carlos Rafael. Esteve sempre ao meu lado, superamos distância entre cidades, entre continentes, a falta de tempo e a falta de dinheiro. Nunca vou me esquecer de tudo que fez por mim durante esse período, cuidou da nossa casa, dos nossos filhotes e de mim. Te amo infinitamente.

E finalmente ao meu orientador Dr. Erich Vinicius de Paula, pessoa a qual me orgulho e espelho. Durante esses quase 9 anos de convivência, desde quando entrei pela primeira vez naquele laboratório, como uma mera estagiária, e hoje, finalizando minha tese de doutorado, sempre acreditou e apostou em mim, apesar de todos percalços que surgiram durante o caminho. Me ensinou a ser pesquisadora, me fez amadurecer como pessoa e se tornou mais que meu chefe, meu orientador, se tornou um amigo. Agradeço imensamente por todos os ensinamentos, as proveitosas conversas e a oportunidade de ser sua aluna.

Um muito obrigado a todos estes acima citados, por tornarem este sonho possível.

RESUMO

Introdução: A quebra da barreira endotelial (BE) é considerada um ponto chave na fisiopatologia da sepse, e as vias que participam da regulação fisiológica da integridade da BE são hoje considerados promissores alvos terapêuticos no choque séptico. O objetivo do nosso estudo foi investigar o efeito do soro de pacientes com choque séptico sobre a integridade da BE e explorar o papel do heme extracelular, VEGF-A e angiopoietina-2 (Ang-2) como potenciais mediadores da permeabilidade microvascular no choque séptico em humanos. **Métodos:** Para isso, soro de pacientes com choque séptico e voluntários saudáveis foram utilizados para estimular monocamadas de células endoteliais (HUVECs). A integridade da BE foi avaliada por meio da detecção de impedância elétrica, que mede a resistência elétrica transendothelial (TEER) de monocamadas de células endoteliais, e através de estudos morfológicos baseados em imunofluorescência das junções célula-célula. Os níveis séricos de mediadores clássicos da quebra da BE, VEGF-A e Ang-2 e os níveis de heme foram medidos nas mesmas amostras. Nós avaliamos também, o efeito do heme na BE utilizando o mesmo modelo experimental do choque séptico. Do ponto de vista de mecanismos, nós avaliamos o efeito do heme sob a internalização e fosforilação da proteína de junção célula-célula, VE-caderina. **Resultados:** O soro de pacientes com choque séptico ($n = 18$) causou uma redução mais acentuada do TEER do que o soro de voluntários saudáveis ($n = 11$), e essas alterações foram associadas a um aumento na extensão das folgas intercelulares. Os níveis séricos de heme no choque séptico foram semelhantes aos descritos na anemia falciforme. Além disso, apenas os níveis de heme correlacionaram-se tanto com a gravidade da sepse quanto com a ruptura do EB. Finalmente, o heme livre foi capaz de induzir um aumento marcado e transitório na permeabilidade de EB medido por ensaios tanto funcionais como morfológicos. Resultados preliminares sugerem uma tendência de aumento do grau de fosforilação e internalização da VE-caderina em células endoteliais estimuladas com heme. **Conclusão:** Nosso estudo mostrou que o soro de pacientes de choque séptico é suficiente para induzir a ruptura da BE,

e que o heme presente no soro desses pacientes em níveis semelhantes aos observados em outras anemias hemolíticas também pode induzir a ruptura transitória da barreira endotelial. Mostramos também que o heme livre pode exercer um papel na internalização e fosforilação da VE-caderina, porém mais estudos serão necessários para confirmar ou refutar esse fato. Estes resultados abrem caminho para a investigação de estratégias terapêuticas destinadas a limitar a disponibilidade de heme extracelular na sepse humana.

Palavras chave: choque séptico; células endoteliais; junções aderentes; caderinas.

ABSTRACT

Background: Endothelial barrier (EB) breakdown is regarded as a hallmark of sepsis and pathways that participate in the physiological regulation of EB integrity are emerging as promising targets in septic shock. The aim of our study was to investigate the effect of serum from patients with septic shock on EB integrity, and to explore the role of extracellular heme, VEGF-A and angiopoietin-2 (Ang-2) as potential mediators of microvascular permeability in human septic shock. **Methodology:** Serum from patients with septic shock and healthy volunteers was used to stimulate HUVEC monolayers. EB integrity was assessed by electric cell-substrate impedance sensing, which measures the transendothelial electrical resistance (TEER) of endothelial cell monolayers, and by immunofluorescence-based morphological studies of cell-cell junctions. Serum levels of classical mediators of EB function, VEGF-A, Ang-2 and heme were measured in the same samples. The effect of heme on EB function was then assessed using the same experimental model. From a mechanism standpoint, we evaluated the effect of heme on the internalization and phosphorylation of the cell-cell junction protein, VE-cadherin. **Results:** Sera from patients with septic shock (n = 18) induced a more pronounced decrease of TEER than sera from healthy volunteers (n = 11), and these alterations were associated with a increase in the extension of intercellular gaps. Serum levels of heme in septic shock were similar to those described in sickle cell anemia. Moreover, only heme levels correlated with both sepsis severity and with EB disruption. Finally, free heme was capable to induce a marked and transient increase in EB permeability as measured by both functional and morphological assays. Preliminary results showed a trend increasing the level of phosphorylation and internalization of VE-cadherin in heme-stimulated endothelial cells. **Conclusion:** Our study showed that serum from patients from septic shock is sufficient to induce EB breakdown, and that heme, present in plasma of these patients in levels similar to those observed in other hemolytic anemias can also induce the transient disruption of endothelial barrier. We also showed that free heme may play a role in the internalization and phosphorylation of VE-cadherin, although more data will

be required to confirm or refute this fact. These results pave the way for the investigation of therapeutic strategies aimed at limiting the availability of extracellular heme in human sepsis.

Key-words: septic shock; endothelial cells; adherens junctions; cadherins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Elementos fisiopatológicos da sepse.....	23
Figura 2. Representação das junções aderentes.	26
Figura 3. Internalização da VE-caderina..	27
Figura 4. Esquema ilustrando os efeitos tóxicos do heme.....	34
Figura 5. Mecanismos de proteção contra o heme livre.	35
Figura 6. Funcionamento da leitura de impedância pelo ECIS®.	44
Figura 7. Metodologia ECIS® para avaliação da quebra da BE. Ilustração da metodologia ECIS.	45
Figura 8. Exemplificação da técnica de extração de proteínas para Western Blot.	47
Figura 9. Eletroforese e eletrotransferência de proteínas.	49
Figura 10. Princípio da técnica de biotilação da superfície celular.	50
Figura 11. Traço representativo da detecção de impedância pelo ECIS® após estímulo com soro humano.	55
Figura 12. Porcentagem de decréscimo da resistência transendotelial induzida pelo soro de pacientes com choque séptico e indivíduos saudáveis.....	56
Figura 13. Porcentagem de decréscimo da resistência transendotelial entre os subgrupos de pacientes.	57
Figura 14. Efeito do soro humano na morfologia das células endoteliais.	58
Figura 15. Níveis séricos dos mediadores clássicos envolvidos na quebra da barreira endotelial.	59
Figura 16. Níveis séricos de heme nos pacientes com choque séptico e indivíduos saudáveis.....	61
Figura 17. Correlação dos níveis de heme com o escore de gravidade na sepse e a permeabilidade endotelial	62
Figura 18. Ação do heme nas mudanças da resistência transendotelial.	63
Figura 19. Heme aumenta a permeabilidade em monocamada de células endoteliais.	64
Figura 20. Heme induz modificação na arquitetura das junções aderentes.	65

Figura 21. Sobrevida de pacientes com choque séptico de acordo com os níveis de heme estratificado pelo <i>cutoff</i>	66
Figura 22. Heme livre na promoção da internalização da VE-caderina.	68
Figura 23. Fosforilação da VE-caderina induzida pelo heme.....	69
Figura 24. A viabilidade das células endoteliais não foi afetada pelo heme livre.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cálculo do escore SOFA.....	41
Tabela 2. Anticorpos utilizados para Western Blot	48
Tabela 3. Características dos pacientes	53
Tabela 4. Características dos subgrupos.....	54
Tabela 5. Correlação dos níveis de VEGF e Ang-2 com a gravidade da sepse e a permeabilidade endotelial	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJ	Junções “ <i>Adherens</i> ” ou Junções Aderentes
Ang	Angiopietina
BE	Barreira endotelial
CE	Célula endotelial
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
Hb	Hemoglobina
HMGB1	Grupo de proteína de alta mobilidade
HO	Heme oxigenase
Hp	Haptoglobina
Hx	Hemopexina
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MLC	Cadeia leve de miosina
NET	“ <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> ”; Redes extracelulares de neutrófilos
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PRR	Receptores reconhecedores de padrão
ROS	“ <i>Reactive oxygen species</i> ”; Espécies reativas de oxigênio
SARA	Síndrome da angústia respiratória aguda

SRIS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SOFA	“Sequential Organ Failure Assessment”
Tie2	“ <i>Tirosyne kinase receptor 2</i> ”; receptor das Angiopoietinas
TLR	Receptores Toll-like
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UTI	Unidade de terapia intensiva
VEC	“Vascular Endothelial-cadherin”; Caderina do endotélio vascular
VEGF	“Vascular endothelial growth factor”; fator de crescimento do endotélio vascular
ZO-1	Zonulina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 SEPSE E CHOQUE SÉPTICO: CONCEITOS E EPIDEMIOLOGIA	20
1.2 A FISIOPATOLOGIA DA SEPSE	21
1.3 O PAPEL DO ENDOTÉLIO NA FISIOPATOLOGIA DO CHOQUE SÉPTICO	23
1.4 MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA INTEGRIDADE DA BE	24
1.4.1 Fosforilação das proteínas das junções adherens	27
1.4.2 Controle da atividade das GTPases Rac1 e RhoA	28
1.5 MECANISMOS POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA QUEBRA DA BE NO CHOQUE SÉPTICO EM HUMANOS ..	29
1.6 ESTRATÉGIAS E OPORTUNIDADES PARA O ESTUDO DE MODULADORES DA PERMEABILIDADE ENDOTELIAL NA FISIOPATOLOGIA DO CHOQUE SÉPTICO	30
1.7 O HEME COMO MEDIADOR INFLAMATÓRIO	31
1.8 CATABOLISMO DO HEME EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS E PATOLÓGICAS	32
1.9 O HEME LIVRE E A RESPOSTA IMUNE INATA	36
1.10 O PAPEL DO HEME NA SEPSE	37
2. OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 PACIENTES E CONTROLES	40
3.2 DEFINIÇÃO DE CHOQUE SÉPTICO	40
3.3 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS	40
3.4 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE	41
3.5 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE VEGF-A, ANG-2 E HEME TOTAL	42
3.6 REAGENTES	42
3.7 CULTURA DE CÉLULAS	43

3.8	AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA BARREIRA ENDOTELIAL	43
3.9	IMUNOFLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL	46
3.10	WESTERN BLOT	47
3.10.1	<i>Lise e extração das proteínas</i>	47
3.10.2	Eletroforese e transferência	48
3.11	BIOTINILAÇÃO DA SUPERFÍCIE CELULAR	49
3.12	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	51
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4.	RESULTADOS	52
4.1	CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES	52
4.2	ANÁLISE FUNCIONAL E MORFOLÓGICA DA BARREIRA ENDOTELIAL	55
4.3	NÍVEIS SÉRICOS DO VEGF-A E ANG-2 E SUA ASSOCIAÇÃO COM A GRAVIDADE DA SEPSE E A PERMEABILIDADE ENDOTELIAL	58
4.4	NÍVEIS SÉRICOS DO HEME E SEU PAPEL NA BARREIRA ENDOTELIAL	60
4.5	HEME E A GRAVIDADE DA SEPSE	61
4.5.1	<i>Heme induz aumento da permeabilidade endotelial em monocamada de HUVEC</i>	62
4.5.2	Estimativa da acurácia diagnóstica dos níveis séricos de heme	65
4.5.3	Análise da mortalidade por choque séptico em 28 dias	66
4.6	HEME LIVRE NA MODULAÇÃO DAS JUNÇÕES ADERENTES	67
4.6.1	Internalização da VE-caderina	67
4.6.2	<i>Fosforilação da VE-caderina</i>	68
4.7	VIABILIDADE CELULAR	69
5.	DISCUSSÃO	71
5.1	A SEPSE COMO UM ESTADO DE HIPERPERMEABILIDADE VASCULAR	71
5.2	A ESCOLHA DA METODOLOGIA ECIS® PARA ANÁLISE DA QUEBRA DA BE	73
5.3	A ASSOCIAÇÃO DO SORO DE PACIENTES COM CHOQUE SÉPTICO COM A QUEBRA DA BE	74
5.4	MEDIADORES CLÁSSICOS DA QUEBRA DA BE NO CHOQUE SÉPTICO	75
5.5	HEME COMO MEDIADOR DA ATIVAÇÃO ENDOTELIAL NO CHOQUE SÉPTICO	77

5.6	MECANISMOS CELULARES DE QUEBRA DA BE INDUZIDO PELO HEME.....	80
5.7	VISÃO INTEGRADA DO PAPEL DO HEME NA QUEBRA DA BE NO CHOQUE SÉPTICO	81
6.	CONCLUSÃO	84
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8.	APÊNDICES	97
	Apêndice 1 - APRESENTAÇÃO DO TRABALHO EM FORMA DE PÔSTER NO CONGRESSO INTERNACIONAL DE HEMOSTASIA E TROMBOSE (ISTH), A SER REALIZADO EM BERLIN EM JULHO DE 2017.....	97
	Apêndice 2. PUBLICAÇÃO NA REVISTA <i>BMC MEDICINE</i>	101
	Apêndice 3. OUTRAS PUBLICAÇÕES COM PARTICIPAÇÃO DA ALUNA DURANTE O DOUTORADO	110
9.	ANEXOS.....	111
	Anexo 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FCM/UNICAMP	111

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sepse e Choque Séptico: conceitos e epidemiologia

A sepsé é uma síndrome clínica caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica secundária a uma infecção (1–3). Porém as manifestações clínicas da sepsé não são causadas apenas pelo patógeno, mas também por uma ativação desregulada dos mecanismos de defesa do hospedeiro (4). Em 1992 foi introduzido o conceito de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS), como um conjunto de alterações clínicas e laboratoriais que caracterizam a resposta inflamatória de um indivíduo a diferentes insultos graves como trauma, sangramentos maciços e infecções (2). Neste contexto, a sepsé passou a ser definida como uma SRIS secundária a uma infecção. Quando associada à disfunção orgânica ou hipotensão arterial, a sepsé é classificada como “grave”; e finalmente, quando esta hipotensão é refratária à reposição volêmica adequada, o quadro passa a ser definido como “choque séptico” (2). A sepsé grave e o choque séptico afetam milhares de pessoas em todo mundo e figuram como a principal causa de morte entre pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) não coronarianas.

A incidência de sepsé é alta, com taxas que variam de 11 a 300 casos/100000 habitantes por ano, com uma taxa de mortalidade variando de 30 a até 80% dependendo da severidade (sepsé, sepsé grave e choque séptico) (5,6). Ao longo dos últimos 35 anos, o entendimento crescente sobre a fisiopatologia celular da sepsé culminou em grandes estudos clínicos, cujos objetivos eram o estabelecimento de tratamentos direcionados a elementos críticos da fisiopatologia da sepsé (7–9). Infelizmente nenhum destes tratamentos resultou em benefícios clínicos significativos, de modo que a busca por alvos terapêuticos relevantes da sepsé permanece como uma importante área de investigação, como recentemente apontado em uma revisão sobre o futuro da pesquisa na sepsé (5).

1.2 A fisiopatologia da sepse

Como dito anteriormente, embora o mecanismo desencadeante da sepse esteja relacionado à exposição do hospedeiro a patógenos invasores, a grande maioria das manifestações clínicas da sepse não são causadas diretamente pelo patógeno, mas sim pela resposta do hospedeiro a esta invasão. Vale ressaltar que a infecção desencadeia uma resposta do hospedeiro muito mais complexa, variável e prolongada, na qual, tanto os mecanismos pró-inflamatórios quanto os anti-inflamatórios podem contribuir para a depuração da infecção e recuperação tecidual, quanto podem ocasionar lesões orgânicas e infecções secundárias (1,10).

A resposta específica irá depender do patógeno causador (carga e virulência) e do hospedeiro (características genéticas e doenças coexistentes), com respostas diferenciais nos diferentes níveis: local, regional e sistêmico. Em geral, acredita-se que as reações pró-inflamatórias (dirigidas à eliminação de patógenos invasores) sejam responsáveis pela lesão tecidual na sepse grave, enquanto que as respostas anti-inflamatórias (importantes para limitar a lesão tecidual local e sistêmica) implicam em uma maior susceptibilidade às infecções secundárias (1).

O reconhecimento da presença de patógenos invasores por células do sistema imune inato se dá através dos receptores reconhecedores de padrões (PRR), que possuem quatro classes principais: receptores do tipo toll (TLR), receptores de lectina do tipo C, receptores do tipo 1 do gene induzíveis do ácido retinóico e receptores do tipo de oligomerização de ligação a nucleotídeos. Esses receptores reconhecem estruturas que são conservadas entre as espécies microbianas, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), resultando na regulação positiva da transcrição de genes inflamatórios e iniciação da imunidade inata. Os mesmos receptores também detectam moléculas endógenas liberadas pelas células lesadas, denominadas padrões moleculares associados a danos (DAMPs), ou alarminas, tais como o grupo de proteína de alta mobilidade B1 (HMGB1), RNA, DNA e histonas extracelulares (11,12).

Do ponto de vista dos PAMPs, o lipopolissacarídeo (LPS) é o exemplo clássico desta classe (13). O LPS é o principal componente da membrana das bactérias gram-negativas, foi descoberto em 1894 pelo médico alemão Richard Friedrich Johannes Pfeiffer que lhe concedeu o termo "endotoxina". É estimado que cada célula bacteriana contenha cerca de 2 milhões de moléculas de LPS, cobrindo cerca de 75% da superfície de membrana (14). O LPS se liga a receptores da resposta imune inata como o CD14 e o TLR-4, levando à expressão de genes pró-inflamatórios e ao conjunto de alterações moleculares e celulares que caracterizam a resposta do hospedeiro à infecção. De forma geral, esta resposta é caracterizada por: (1) ativação local da coagulação, cujo benefício pode ser o de restringir a disseminação da infecção; (2) ativação global do sistema imunológico, com aumento da produção de citocinas inflamatórias e da atividade citotóxica e fagocítica; e (3) ativação endotelial, cujos benefícios imediatos podem ser a facilitação da chegada de fagócitos ao sítio da infecção por aumento da adesão e facilitação da transmigração aos tecidos. De acordo com este modelo fisiopatológico, podemos imaginar que a lesão tecidual e as consequências clínicas da sepse grave decorrem da exacerbação de cada um destes processos, que clinicamente se apresentaria como CIVD, tempestade de citocinas e desintegração da barreira endotelial (Figura 1) (4).

Uma descrição detalhada deste paradigma, com foco na discussão do papel da ativação da hemostasia durante a sepse foi objeto de uma revisão publicada por nosso grupo durante o doutorado (Anexo 2) (15).

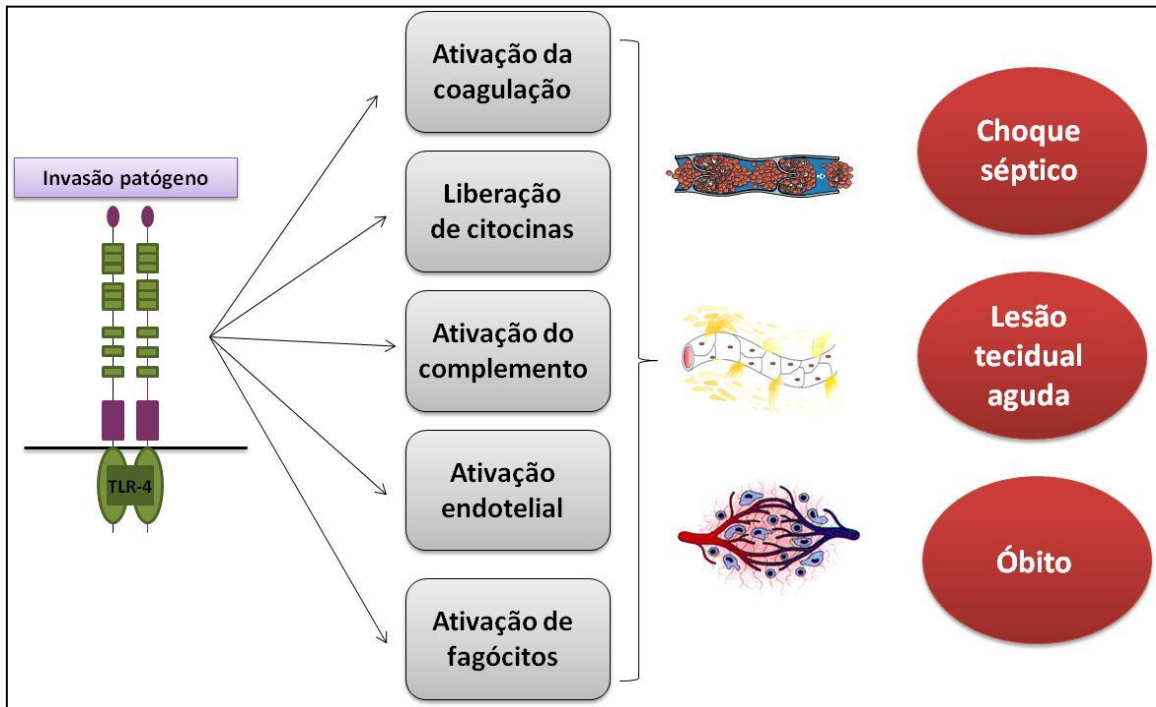


Figura 1. Elementos fisiopatológicos da sepse. Esquema ilustrando a fisiopatologia da sepse, como destaque para os elementos que constituem a resposta do hospedeiro à infecção (em cinza). Quando exacerbados, estes elementos podem levar às complicações da sepse (em vermelho).

1.3 O papel do endotélio na fisiopatologia do choque séptico

Tendo em mente a cascata de eventos da fisiopatologia da sepse citada acima, é importante destacar que nosso estudo teve como foco a ativação endotelial. Por isso, apresentaremos a seguir os mecanismos que o mantêm íntegro, assim como os fatores que causam sua ativação e consequente desarranjo em sua estrutura.

O endotélio é a estrutura localizada na interface entre tecidos e sangue. Sob condições fisiológicas, as células endoteliais (CE) estão sob intensa atividade metabólica, relacionada a duas funções principais: (1) manutenção das propriedades anticoagulantes da luz endotelial, e (2) manutenção de uma barreira seletiva entre sangue e tecidos, função conhecida como barreira endotelial (BE). A resposta

inflamatória sistêmica que caracteriza a sepse envolve a liberação maciça de citocinas, a ativação da coagulação e a quebra BE (1). No entanto, embora a quebra da BE seja considerada um dos mecanismos fisiopatológicos da sepse, é importante destacar que este processo é parte da resposta do organismo a um patógeno invasor. De fato, a presença de patógenos na circulação ou nos tecidos perturba o equilíbrio do endotélio através de receptores relacionados à resposta imune inata, e resulta em um conjunto de alterações celulares e moleculares coletivamente chamadas de “ativação endotelial”, do qual a quebra da BE é uma das características mais marcantes (16). Nesta situação, a quebra localizada e transitória da BE tem por objetivo facilitar a adesão e a diapedese de leucócitos, para que estes tenham acesso ao patógeno nos tecidos (4). Quando localizada e adequadamente regulada, esta quebra da BE pode ser vista como a etapa inicial de uma parte importante da defesa do hospedeiro a uma infecção, permitindo a fagocitose ou citotoxicidade mediada por leucócitos, e a formação de redes compostas por neutrófilos e fibrina (NETs), que auxiliarão na contenção de um foco infeccioso (17). Por outro lado, este mesmo mecanismo potencialmente benéfico, pode se tornar um elemento crítico da fisiopatologia de doenças como o choque séptico e a síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA), se ativado de forma desregulada no que diz respeito à perda da localização ou à intensidade. Por ser parte integrante da resposta inflamatória sistêmica que caracteriza a sepse, a quebra da BE é hoje reconhecida como um potencial mecanismo fisiopatológico e um promissor alvo terapêutico no choque séptico (5).

1.4 Mecanismos de regulação da integridade da BE

Os mecanismos celulares e moleculares de regulação da integridade da BE foram descritos nas duas últimas décadas a partir do estudo da angiogênese embrionária, e mais recentemente, da fisiologia das junções *adherens*. A angiogênese embrionária é um processo finamente controlado que exige a regulação

dinâmica da integridade da BE, para que novos brotos vasculares possam ser incorporados à árvore vascular em formação (18). A partir do estudo da formação e da desintegração de junções entre CE durante a angiogênese, a BE deixou de ser considerada uma barreira estática à passagem de solutos e passou a ser entendida como um complexo multiproteico ativo, responsável pela regulação seletiva da permeabilidade endotelial. Neste modelo, as junções intercelulares, e mais especificamente as junções *adherens*, são consideradas as principais estruturas reguladoras e mantenedoras da BE, atuando tanto como barreira física à passagem de solutos, quanto como *hubs* para a transdução de sinais de diversas naturezas para o interior das CE (19,20).

O principal componente das junções “adherens” em CE é a proteína transmembrana VE-caderina, cuja importância funcional é ilustrada pela letalidade embrionária de camundongos *knockout*, em decorrência de graves malformações do sistema cardiovascular (21). A VE-caderina, identificada pela primeira vez em 1991, possui um domínio extracelular, uma região transmembrana de passagem única, e uma cauda citoplasmática conservada, além de ser expressa exclusivamente em CE (19). A interação homofílica em *trans* entre os domínios extracelulares da VE-caderina de CE adjacentes forma uma estrutura “em zíper”, que é responsável pela integridade da BE. Outros componentes funcionais importantes da VE-caderina são sua cauda citoplasmática, e as proteínas associadas a esta cauda. A cauda citoplasmática é a responsável pela interação da VE-caderina com proteínas associadas (alfa e beta catenina) que ancoram a junção ao citoesqueleto celular, e exercem papel crítico na manutenção da BE (Figura 2).

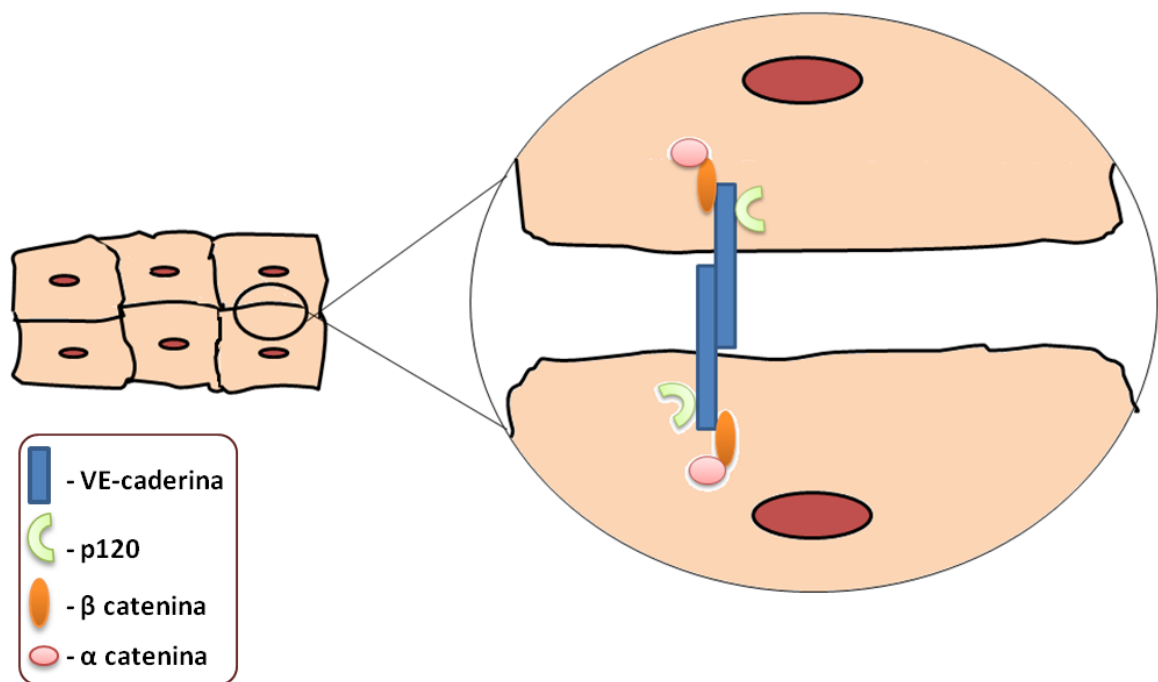


Figura 2. Representação das junções aderentes.

As interações da VE-caderina com as cateninas representam pontos críticos da regulação da retenção da VE-caderina na membrana, e por consequência, da integridade da BE. No embrião e em culturas de CE, estas interações são reguladas por mediadores como o VEGF-A, angiopoietinas (Ang) e a trombina, que ao modificarem o padrão de fosforilação de proteínas das junções *adherens*, podem levar à internalização da VE-caderina, e à ruptura da BE (Figura 3).

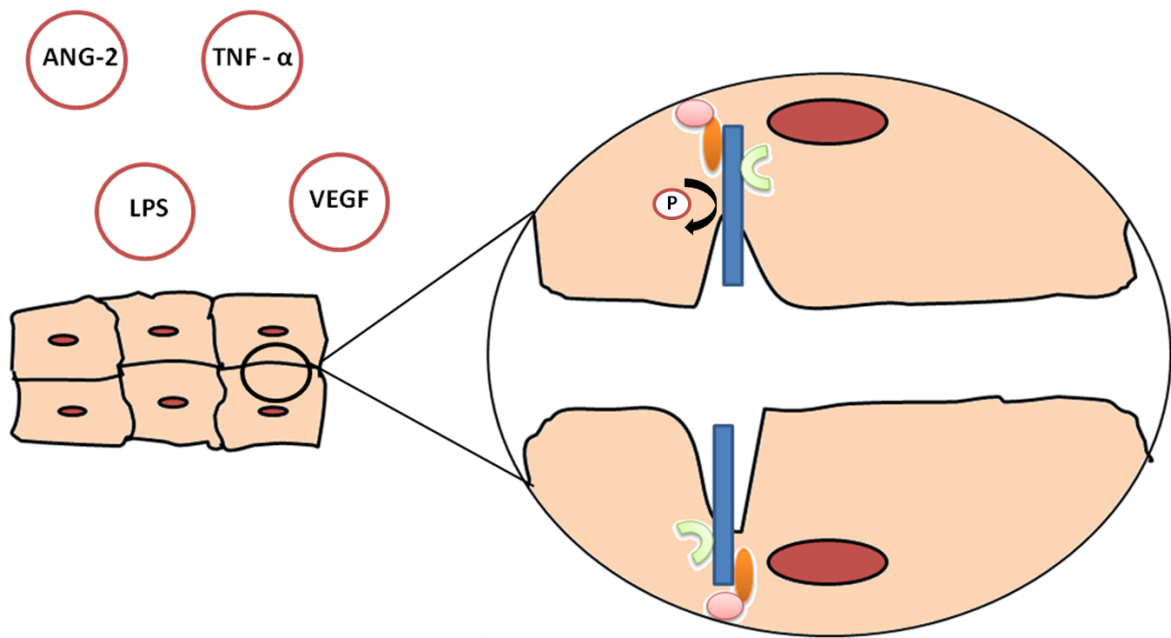


Figura 3. Internalização da VE-caderina. Esquema ilustrativo mostrando o mecanismo de regulação da estabilidade da VE-caderina. Estímulos como o VEGF, TNF- α , trombina e angiopoietinas levam à fosforilação da VE-caderina (azul) e à dissociação das cateninas, o que culmina na sinalização para que a VE-caderina seja internalizada por endocitose, causando assim uma ruptura nas junções aderentes.

Atualmente, os dois principais mecanismos de regulação da integridade da BE são: (i) a regulação da fosforilação de proteínas das junções “adherens”, e (ii) o controle da atividade das GTPases Rac1 e RhoA (22).

1.4.1 Fosforilação das proteínas das junções adherens

Um dos principais mecanismos reguladores da estabilidade das junções *adherens* é o equilíbrio entre a fosforilação e a desfosforilação da VE-caderina e de outras proteínas destas junções. Em repouso, fosfatases associadas à VE-caderina (como a VE-PTP, DEP-1 e SHP-2) mantêm seu estado defosforilado, que é associado à estabilidade da BE. Em condições inflamatórias, o VEGF é capaz de induzir a internalização da VE-caderina ao promover a fosforilação de dois resíduos de tirosina (Y658 e Y731) desta proteína que correspondem aos sítios de ligação da

p120-catenina e beta-catenina respectivamente. A fosforilação do resíduo Y658, dependente de c-src, libera a p120-catenina de seu sítio de ligação, e leva à endocitose da VE-caderina, no que parece ser um dos pontos críticos de controle da estabilidade da BE. Outros resíduos relevantes para este processo incluem o Y685 e S665 na VE-caderina, cuja fosforilação é induzida por mediadores como a trombina, TNF- α , histamina e bradicinina (22–24).

Além da fosforilação ativa de resíduos da VE-caderina como mecanismo regulador da internalização da VE-caderina, estudos recentes sugerem que dissociação de fosfatases associadas à VE-caderina também exercem papel importante na regulação do seu estado de fosforilação. Assim, foi demonstrado que o VEGF-A é capaz de induzir a dissociação das fosfatases SH2 e VE-PTP, levando a aumento da fosforilação de resíduos responsáveis pela sua estabilidade, e promovendo sua internalização (22,25).

1.4.2 Controle da atividade das GTPases Rac1 e RhoA

A família Rho de GTPases incluem mais de 20 membros dos quais RhoA, Rac1 e Cdc42 são os principais reguladores da função do esqueleto de actomiosina e da formação de junções intercelulares (26). A via da RhoA pode exercer funções antagônicas ao promover a formação de filamentos de actomiosina que incluem a ruptura ou estabilização de barreiras celulares. Esta via é controlada por reações de fosforilação mediadas por seus efetores Rho quinases (ROCK) que promovem a contração celular através da fosforilação da proteína miosina de cadeia leve (MLC) (27). Além desta, RhoA, Rac1 e Cdc42 também são necessárias para a manutenção da BE ao mediar a formação de fibras de actina que se ligam as proteínas juncionais como a ZO-1 e as cateninas. Tanto as junções *tight* quanto *adherens* formam complexos com fatores ativadores de GTPases (GEFs) que ativam RhoA, Rac e Cdc42. Estas interações aumentam a formação de F-actina, e regulam a endocitose dos complexos juncionais (28–30).

Em repouso, a ativação constante da GTPase Rac1 é considerada essencial para a manutenção da integridade da BE. Esta ativação é dependente de AMPc, e é crucial para a ligação homofílica da VE-caderina na formação das junções *adherens*. Por sua vez, a presença da VE-caderina ligada estimula a ativação de Rac1 em um mecanismo bidirecional autócrino de regulação da integridade da BE. Outras vias de sinalização iniciadas por proteínas destas junções (tais como Tiam1, Vav2, Epac1 e Rap1) também convergem para a ativação autócrina de Rac1. Além disso, ligantes externos à junção como o S1P (sphingosine-1 phosphate) e Ang-1 também contribuem para a ativação de Rac1 e para a estabilização da BE (22,28,31).

Em condições inflamatórias, mediadores como o TNF- α e a trombina reduzem os níveis intracelulares de AMPc inibindo a ativação de Rac1 e promovendo a ativação de RhoA, o que leva a desestabilização da BE. A liberação de Ang-2 pelas CE é outro mecanismo de inativação de Rac1, que ocorre pela redução da ligação de Ang-1 ao receptor Tie-2, comum para as duas angiopoietinas (22,31).

1.5 Mecanismos potencialmente envolvidos na quebra da BE no choque séptico em humanos

Vários dos mediadores envolvidos na formação e regulação da BE no embrião, ou nas cascatas de sinalização responsáveis pela regulação da integridade da BE, encontram-se significativamente elevados em pacientes com choque séptico, sugerindo que estas mesmas vias e mediadores possam estar envolvidos na fisiopatologia do choque séptico. Como exemplo, proteínas que desestabilizam as junções endoteliais no embrião como o VEGF-A e Ang-2 encontram-se aumentados em pacientes com choque séptico, ao passo que proteínas responsáveis pela estabilização da BE como a Ang-1, encontra-se reduzida neste mesmo grupo (32–34). Embora importantes do ponto de vista clínico, e sugestivas de uma relevância fisiopatológica destes mediadores, estas associações estatísticas não confirmam a participação direta destas vias na quebra da BE no choque séptico, nem tampouco os mecanismos pelos quais esta quebra estaria ocorrendo. Mais recentemente, a

participação do DAMP HMGB1 como indutor da quebra da BE no choque séptico foi sugerido (35,36). Assim, não é exagero afirmar que ainda são desconhecidos o papel relativo das vias reguladoras da integridade da BE na fisiopatologia do choque séptico.

1.6 Estratégias e oportunidades para o estudo de moduladores da permeabilidade endotelial na fisiopatologia do choque séptico

Diante dos inúmeros fracassos de estudos clínicos para a sepse baseados em dados obtidos em modelos celulares e animais, e do recrudescimento da discussão sobre a validade de modelos animais de sepse (37), muita cautela é necessária antes da confirmação do papel de moduladores permeabilidade endotelial na fisiopatologia do choque séptico. Com exceção de um estudo realizado em camundongos geneticamente modificados (38), todos os estudos que descreveram os mecanismos de quebra da BE consistiram em experimentos controlados avaliando pontos específicos da cascata de eventos que leva à quebra da BE, e que utilizaram estímulos relativamente artificiais como proteínas recombinantes como o VEGF e a trombina, entre outros. Apenas dois estudos com amostras humanas tentaram reproduzir de forma sistemática a quebra da BE no contexto da sepse humana (39,40).

Por fim, é razoável afirmar que, ao contrário de outros aspectos da fisiopatologia do choque séptico como a liberação maciça de citocinas inflamatórias e a ativação da coagulação, a quebra da BE pode ser vista como um evento terminal da cascata fisiopatológica da sepse, com consequências potencialmente relevantes para a evolução clínica do choque séptico entre as quais a lesão pulmonar aguda. Em outras palavras, por representar um dos potenciais mecanismos efetores do dano tecidual na sepse, a quebra da BE pode ser vista como um dos mais atrativos alvos terapêuticos para esta condição.

1.7 O heme como mediador inflamatório

O heme é um grupo prostético de diversas proteínas (hemeproteínas), composto de um anel tetrapirrólico (protoporfirina IX) com um átomo de ferro em estado reduzido (Fe^{2+}) em seu interior. Quando ligado a estas hemeproteínas, o heme desempenha um papel essencial para numerosos processos biológicos, sendo uma molécula essencial para diversas formas de vida. Sua estrutura permite ao heme participar de vários processos celulares em que a rápida transição entre os estados oxidativos do ferro é interessante do ponto de vista funcional. Dentre estes processos, o transporte de oxigênio para os tecidos é certamente o mais conhecido (41).

Apesar de sua importância dentro da célula, o heme livre pode ser bastante tóxico para células e tecidos. Esta toxicidade é mediada tanto pela ação direta do heme sobre membranas celulares quanto por mecanismos indiretos, mediados pelo sistema imune inato. As ações diretas decorrem do caráter anfipático do heme, que se intercala nas membranas celulares promovendo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) levando a lesão celular, e são reconhecidos há algumas décadas (42). Já os mecanismos indiretos, baseados na demonstração que o heme livre é um ativador da resposta imune inata passaram a ser estudados mais recentemente, e levaram ao conceito atual de que o heme livre atua como uma alarmina (43).

Como resultado de diversas patologias, com destaque para as anemias hemolíticas congênitas, microangiopatias trombóticas, hemorragia subaracnóidea e doenças infecciosas (como a malária), grandes quantidades de hemeproteínas podem ser liberadas no plasma, contribuindo assim para a fisiopatogenia destas condições (44,45). Dentre estas patologias, destaca-se a sepse, que ao menos em modelos animais, tem no heme livre um dos mediadores de sua fisiopatologia (46).

1.8 Catabolismo do heme em condições fisiológicas e patológicas

A principal fonte de heme em mamíferos é a hemoglobina (Hb). A Hb representa a principal proteína das hemácias, cuja função primária é o transporte de oxigênio (O_2) dos pulmões até os tecidos periféricos. As Hb humanas são proteínas tetraméricas globulares formadas pela combinação de duas globinas (cadeias polipeptídicas) do “tipo α ” (α ou ζ) com duas globinas do “tipo não- α ” (β , δ , γ ou ϵ). Cada cadeia está ligada a uma molécula de heme. No adulto, a Hb mais abundante é a HbA, formada por duas cadeias “ α ” e duas cadeias “ β ”. O ciclo de vida normal de uma hemácia dura cerca de 120 dias, após o qual as hemácias senescentes são fagocitadas por macrófagos do sistema reticulo-endotelial do baço e eliminadas da circulação (47).

A degradação da Hb dentro destas células resulta na liberação do heme, cujas concentrações intracelulares devem ser rigorosamente controladas, tanto para a eliminação de seus efeitos tóxicos quanto para reaproveitamento do átomo de ferro. Esta regulação é feita principalmente pela enzima heme-oxigenase (HO) (48). Existem duas isoformas de heme-oxigenases: HO-1 e HO-2, codificadas pelos genes *HMOX1* e *HMOX2*, respectivamente (49,50). A HO-2 é constitutivamente expressa pela maioria das células (50) e conduz o catabolismo do heme em condições homeostáticas. Por outro lado, o excesso de heme induz a expressão da isoforma HO-1, aumentando a taxa de catabolismo do heme e, como tal, evitando seus efeitos citotóxicos (51). A atividade da HO catalisa a oxidação e clivagem do anel protoporfirina IX, produzindo biliverdina (BV), concomitante com a liberação de quantidades equimolares de ferro e monóxido de carbono (CO). A biliverdina é metabolizada em bilirrubina pela biliverdina redutase. Já o ferro é rapidamente direcionado para armazenamento ou para produção de novas moléculas de Hb, através de sua ligação à ferritina ou à transferrina respectivamente.

Um aspecto muito importante desta via é que tanto a bilirrubina quanto o CO possuem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anti-apoptóticas. Além disso, o heme também ativa a expressão de outros genes ligados ao fator de

crescimento *Nrf2*, cujo efeito final é antioxidativo e anti-inflamatório. Desta forma, a presença do heme ativa importantes vias anti-inflamatórias dependentes e independentes de HO-1 que também contribuem para a neutralização a toxicidade do heme (41).

Em condições fisiológicas, o sistema intracelular de regulação do heme é suficiente para evitar sua toxicidade direta e indireta. No entanto, em situações patológicas caracterizadas por aceleração da degradação de hemácias, este sistema se torna insuficiente. Por exemplo, condições associadas a hemólise, particularmente quando intravascular, levam a liberação de Hb livre para a circulação que, uma vez oxidada a metahemoglobina, resulta na liberação de heme livre para a circulação (41) (Figura 4). Outras condições patológicas que também podem cursar com aumento do heme extracelular livre incluem grandes hematomas (pela liberação de Hb das hemácias) e traumas musculares graves (pela liberação de mioglobina) (52–54). Para lidar com este desafio nosso organismo dispõe de dois mecanismos adicionais de proteção, que serão abordados em seguida.

A haptoglobina (Hp) é uma proteína de fase aguda sintetizada no fígado e presente em concentrações relativamente altas no plasma (0.3-3mg / mL) (55). A Hp se liga com alta afinidade com a Hb livre, formando um complexo Hb:Hp. Essa ligação previne a oxidação da Hb e, por consequência, a liberação de heme livre na circulação. O complexo Hb:Hp se liga ao CD163 expresso em macrófagos e hepatócitos levando-o a endocitose e degradação (56–58). A Hp, no entanto, pode ser rapidamente saturada e, apesar de sua concentração endógena ser alta, só é suficiente para neutralizar apenas cerca de 0,5% da Hb total dos eritrócitos (59,60) (Figura 5). Portanto, outro mecanismo de proteção contra o heme se faz necessário.

A hemopexina (Hx) também é uma proteína de fase aguda presente em altas concentrações no plasma (0,6-1,2 mg / mL), com uma maior afinidade de ligação com o heme livre do que qualquer outra proteína já descrita (61,62), tornando esta ligação praticamente irreversível. Quando a Hx se liga ao heme livre, formando o complexo Heme:Hx, este é reconhecido pelo receptor CD91 expresso pelos

macrófagos e hepatócitos (63), onde o heme é então catabolizado intracelularmente pela ação da HO. Já a Hx não é degradada por macrófagos, sendo reciclada de volta para a circulação. Como consequência, a Hx é menos propensa a um esgotamento completo da circulação quando comparado com a Hp (60,63). Quando a Hx é saturada devido a uma liberação excessiva de heme, proteínas como a albumina, α 1-microglobulina, e lipídios são capazes de se ligar ao heme, com menor afinidade do que a Hx, retirando-o da circulação (64–66) (Figura 5).

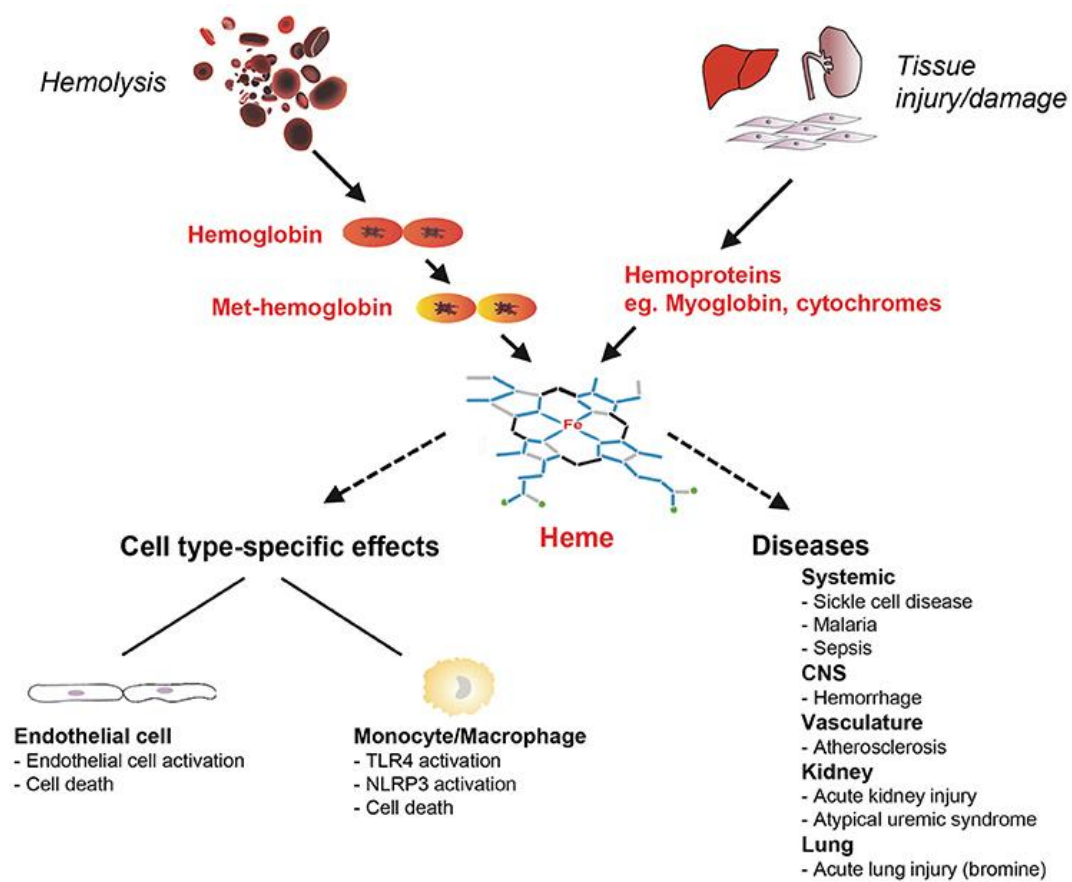


Figura 4. Esquema ilustrando os efeitos tóxicos do heme. O heme livre pode ter como fonte a hemólise, que leva à oxidação da hemoglobina (Hb) para Met-Hb, ou de dano tecidual e lesão de hemoproteínas intracelulares. O heme tem efeitos pró-oxidantes, pró-inflamatórios e citotóxicos e pode causar efeitos específicos em células endoteliais e monócitos / macrófagos. (Fonte: Sacerdoti et al, 2017) (67)

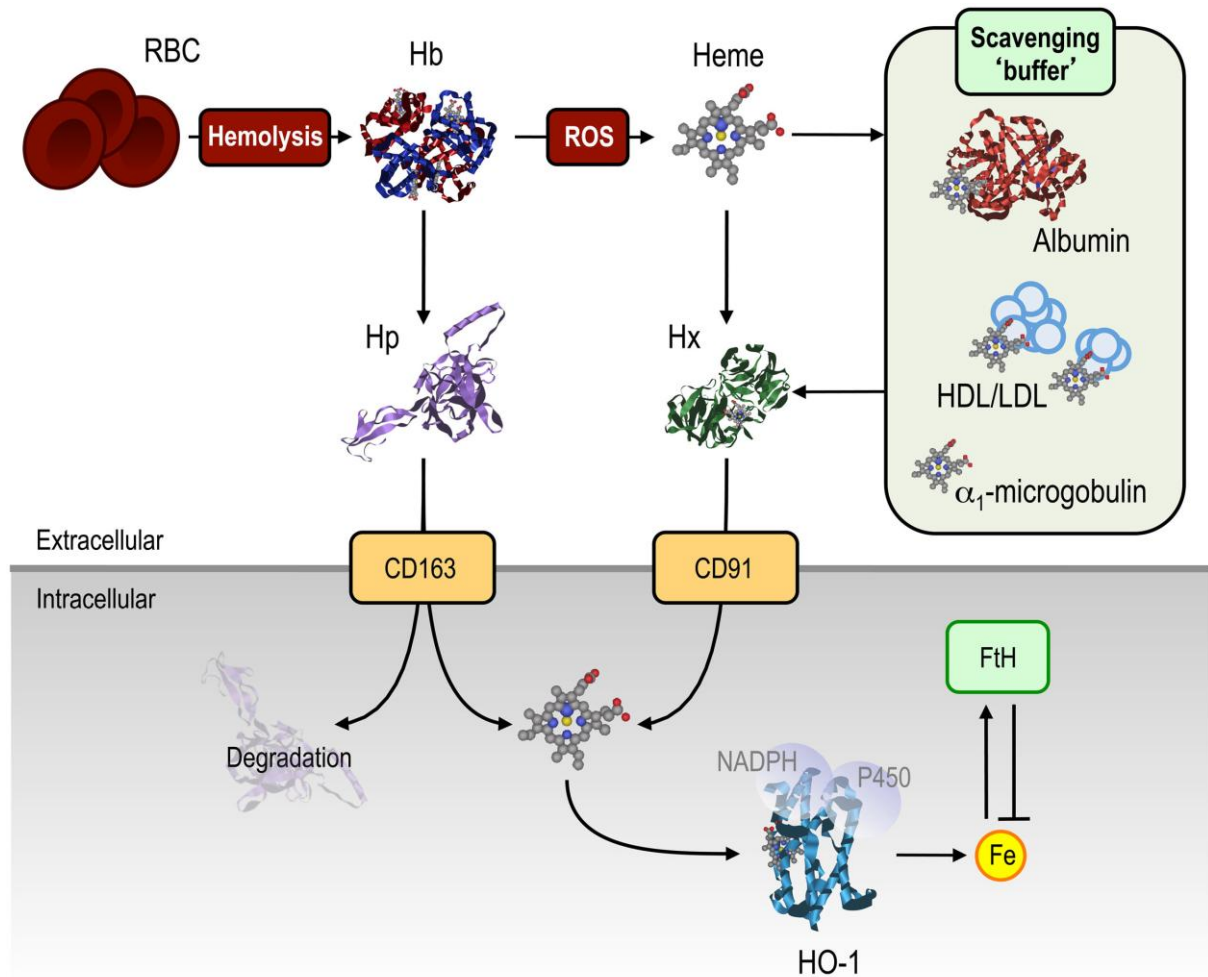


Figura 5. Mecanismos de proteção contra o heme livre. Uma gama de mecanismos extracelulares conferem proteção contra a Hb e o heme livres. Sob condições hemolíticas a Hb é liberada dos eritrócitos para a circulação, de onde é retirada pela Hp, impedindo assim sua oxidação e permitindo a captação dos complexos Hb: Hp através do receptor CD163. Uma vez que a capacidade de eliminação da Hp está esgotada, a Hb sofre oxidação, liberando então os seus grupos heme. Estes podem se ligar à albumina, HDL e LDL, α₁-microglobulina e finalmente à Hx, que tem maior afinidade com o heme livre. Os complexos Hx:heme são capturados através do receptor CD91, e internalizados no fígado, onde o heme é catabolizado pela HO-1. Abreviaturas: Fe, ferro; FtH, ferritina; Hp, haptoglobina; Hb, hemoglobina; HDL/LDL, lipoproteína de alta/baixa densidade; Hx, hemopexina; ROS, espécie reativa de oxigênio. (Fonte: Larsen et al, 2012) (41)

1.9 O heme livre e a resposta imune inata

Em 2001, Wagener e colaboradores mostraram pela primeira vez que o heme livre era capaz de ativar uma série de efeitos reconhecidamente ligados à imunidade inata tais como recrutamento e adesão de leucócitos ao endotélio, produção de citocinas inflamatórias e quebra da barreira endotelial (BE) (68). Logo em seguida, Graça-Souza e colaboradores, em um estudo realizado no Rio de Janeiro demonstraram que o heme era capaz de ativar neutrófilos (69). Sabia-se que o heme possuía um papel pró-inflamatório, porém, não se sabia como o heme interagia com a membrana celular e assim modulava células do sistema imune (70). A primeira demonstração mecanística do papel do heme como ativador da imunidade inata foi publicada em 2007 quando Figueiredo e colaboradores (71) demonstraram que o excesso de heme induzia a secreção de TNF- α em macrófagos via ligação com o receptor TLR-4, ao passo que macrófagos *knockout* para o receptor TLR-4, ao serem estimulados com heme não secretavam TNF- α , caracterizando então o heme como um ativador da resposta imune inata.

Desde então, diversos estudos mostraram que o heme é capaz de ativar outras vias da imunidade inata tais como aquelas dependentes da quinase Syk (que medeiam um efeito de sinergia entre heme e endotoxina) (72), o sistema complemento (73), a ativação do inflamassoma NLRP3 (74), a formação de redes extracelulares de neutrófilos (75), a formação de agregados proteicos atípicos (76) e mais recentemente, a ativação da coagulação dependente de fator tecidual (77), demonstrada em nosso laboratório.

Quanto à relevância fisiopatológica destes efeitos, muito do que se sabe provém de estudos que utilizam a doença falciforme com modelo, condição em que o heme livre é resultado de um quadro hemolítico massivo. Um estudo publicado em 2013 demonstrou que o heme livre é capaz de desencadear um quadro de lesão pulmonar aguda semelhante à STA em dois modelos animais de doença falciforme, e que este quadro pode ser revertido pelo uso de hemopexina e inibidores de TLR-4, sugerindo que a ativação da resposta imune inata pelo heme pode estar relacionada

a esta forma de lesão pulmonar aguda (78). Indo na mesma direção, um estudo publicado em 2014 mostrou a capacidade do heme livre em desencadear fenômenos vaso-oclusivos em dois modelos distintos de doença falciforme, assim como a possibilidade de reversão da vaso-occlusão através do uso de inibidores de TLR-4, ou de moléculas capazes de sequestrar o heme como a hemopexina (79). Mais recentemente, foi demonstrada a capacidade do heme livre em ativar a coagulação em modelos animais, via TLR-4 (80).

Em conjunto, estes dados permitem a construção de um paradigma no qual o heme atua como uma alarmina, que constituem um grupo heterogêneo de moléculas endógenas que sinalizam danos celulares quando detectados extracelularmente. Quando o heme é liberado de células vermelhas ou musculares danificadas, a hemoglobina e mioglobina oxidadas liberam seu grupo prostético heme. Isso gera o heme livre, que é detectado por PRRs expressos por células imunes inatas e, possivelmente, por células T reguladoras (T_{REG}) (43).

1.10 O papel do heme na sepse

Apesar do crescente conhecimento do papel do heme na resposta imune inata e na inflamação, estudos demonstrando a ação do heme livre na sepse e no choque séptico são escassos. Em 2010 Larsen e colaboradores avaliaram o papel do heme na patogênese da sepse grave em camundongos submetidos a ligadura e punção cecal (CLP) (46). Neste modelo de sepse o heme sensibilizou os hepatócitos para a morte celular necrótica tornando os camundongos mais susceptíveis à sepse. Além disso, houve uma correlação negativa entre a concentração sérica de Hx e lesão tecidual em pacientes com choque séptico. Deste modo, pacientes com choque séptico que apresentaram maiores concentrações séricas de Hx tinham menos dano tecidual e uma melhor sobrevida (46). Nessa mesma linha, dois estudos demonstraram que níveis séricos diminuídos de Hp e Hx estão relacionados com um pior prognóstico em pacientes com sepse (81,82).

Perante o exposto, torna-se tentador acreditar que o heme possui um importante papel na fisiopatologia do choque séptico, através da ativação da resposta imune inata e consequente ativação endotelial.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Explorar a relevância biológica da quebra da BE no choque séptico, assim como potenciais mediadores e mecanismos ligados a este evento.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do soro de pacientes com choque séptico sobre:
 - Ensaio funcional da integridade da BE em monocamadas de HUVECs
 - Formação de lacunas endoteliais em monocamadas de HUVECs
- Avaliar a associação dos níveis séricos de Ang-2, VEGF-A e heme com a quebra da BE induzida pelo soro de pacientes com choque séptico
- Avaliar o efeito do heme sobre:
 - Ensaio funcional da integridade da barreira endotelial em monocamadas de HUVECs
 - Formação de lacunas endoteliais em monocamadas de HUVECs
 - Imunolocalização e tráfego da VE-caderina

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes e controles

Foram incluídos neste estudo pacientes diagnosticados com choque séptico da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) ou da Enfermaria de Hematologia da Universidade de Campinas, no período de 2013 e 2014. Como voluntários saudáveis, foram incluídos membros da equipe do laboratório. O estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinque e aprovado pelo comitê de ética local, através do parecer 1261/2011. O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os indivíduos ou seus representantes legais antes de qualquer procedimento do estudo.

3.2 Definição de choque séptico

O diagnóstico de choque séptico foi definido com base nos critérios da chamada “*Surviving Sepsis Campaign*” (83), e estabelecido na presença de dois ou mais critérios de SRIS em pacientes com infecção documentada ou suspeita, associado a hipotensão (pressão sistólica <90 mmHg) refratária à reposição volêmica adequada (pelo menos 2L em 6 horas).

Os pacientes foram ainda estratificados de acordo com a gravidade do quadro no momento da coleta através do cálculo do escore de avaliação de disfunção orgânica na sepse, o *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA; Tabela 3), que foi desenvolvido para quantificar as disfunções hepática, renal, pulmonar e cardiovascular e tornar grupos de pacientes distintos comparáveis para o propósito de estudos clínicos (84).

3.3 Coleta de dados clínicos e laboratoriais

Os dados clínicos foram obtidos diretamente do prontuário médico, e coletados ao longo da internação.

Dados clínicos:

- Nome, sexo, data de nascimento, diagnóstico, presença de comorbidades clínicas, temperatura máxima dos picos febris, pressão arterial média, necessidade de uso de drogas vasoativas, presença de foco infeccioso clinicamente determinado, cálculo do escore SOFA (Tabela 1) (84) e evolução clínica.

Tabela 1. Cálculo do escore SOFA

Pontos	0	1	2	3	4
PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	>400	≤400	≤300	≤200 *	≤100 *
Creatinina (mg/dl) ou débito urinário	<1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 < 500 ml/d	≥5,0 <200 ml/d
Bilirrubinas (mg/ dl)	<1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	≥12
Hipotensão	Não	PAM<70	Dopa≤5 ou Dobuta	Dopa>5 ou Nora≤0,1**	Dopa>15 ou nora** >0,1
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	> 150	≤150	≤100	≤50	≤20
Escala de Coma de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6

*com suporte ventilatório; ** drogas adrenérgicas administradas por pelo menos 1 hora (dose em µg/Kg/min); PAM: pressão arterial média; Dopa: dopamina; dobuta: dobutamina; nora: noradrenalina

Dados laboratoriais

- Contagem absoluta de neutrófilos, contagem de plaquetas, creatinina, bilirrubina, resultado de culturas e de exames de imagem.

3.4 Coleta e preparação das amostras de sangue

As coletas foram realizadas através de punção venosa periférica ou através de cateter venoso central (nos pacientes com este dispositivo), pela equipe

de enfermagem das enfermarias após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos responsáveis legais ou pelos pacientes. As amostras foram então submetidas à coagulação natural à temperatura ambiente durante 30 minutos e então centrifugadas em centrífuga refrigerada, a 4 ° C , 1000 x g, por 15 minutos. Todas as amostras foram submetidas ao mesmo processamento. O soro obtido foi imediatamente separado em alíquotas e armazenado a – 80 ° C até o uso.

3.5 Análise dos níveis séricos de VEGF-A, Ang-2 e Heme total

Os níveis séricos de VEGF-A e Ang-2 foram medidos em duplicata através de ensaio imuno-enzimático (ELISA) utilizando kits comerciais (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). A sensibilidade do kit para dosagem de VEGF foi de 9 pg / ml, e os coeficientes de variação intra-ensaio e interensaio foram de 4,5%-6,7% e de 6,2%-8,8%, respectivamente. A sensibilidade do kit para dosagem de Ang-2 foi de 3,5 pg / ml e os coeficientes de variação intra-ensaio de 2,6% -3,8% e de 5,5% -9,8%, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de heme foram determinados em triplicata através de espectrofotometria utilizando kit comercial (QuantiChrome Heme Assay kit, DIHM-250, BioAssay Systems). O limite linear de detecção dos níveis de heme foi é 0,6 – 125 µM, de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 Reagentes

O meio de cultura endotelial EGM-2 e as células primárias humanas endoteliais de veias umbilicais (HUVEC) foram obtidos da Lonza (Walkersville, EUA). O Heme foi obtido da Frontier Scientific, dissolvido em TRIS 0,1 M e diluído em EBM-2. A solução de trabalho de heme foi preparada no escuro imediatamente antes da utilização. O tampão de lise RIPA (R0278) e o coquetel inibidor de protease (P8340) foram adquiridos da Sigma. O VEGF-165 recombinante humano foi adquirido da R & D Systems e utilizado na concentração 50ng / ml.

3.7 Cultura de células

As HUVECs foram cultivadas em frascos de 75 cm² em meio EBM-2 suplementado com o kit de fatores de crescimento EGM-2 e incubadas a 37 ° C com 5% de CO₂. O meio foi substituído a cada 48 horas. Quando alcançado 80% de confluência, as células endoteliais foram tripsinizadas, contadas e utilizadas nos ensaios ou replicadas para manutenção da linhagem. Todos os experimentos foram realizados com células entre a 3^a e 5^a passagem.

3.8 Avaliação funcional da barreira endotelial

A integridade da barreira endotelial foi avaliada através do sistema ECIS® (Electric Cell-substrat Impedance Sensing, Applied BioPhysics, Troy, NY). O ECIS é um método baseado em impedância, utilizado para estudar as atividades celulares *in vitro* em tempo real. Estas incluem alterações morfológicas, locomoção celular e outros comportamentos dirigidos pelo citoesqueleto das células. Para a avaliação em tempo real da função da BE, mede-se a resistência elétrica transendotelial (TEER), representando uma estimativa razoável da permeabilidade paracelular.

Uma pequena corrente alternada (I) é aplicada através do padrão do eletrodo na parte inferior das placas ou matrizes (*arrays*). Isto resulta num potencial (V) através dos eletrodos que é medido pelo instrumento ECIS. A impedância (Z) é determinada pela lei de Ohm $Z = V / I$. Quando as células são adicionadas a placa ECIS, que é recoberta por eletrodos, elas atuam como isoladores aumentando a impedância. À medida que as células crescem e cobrem os eletrodos, a corrente é impedida de uma maneira proporcional ao número, à morfologia, e à natureza da ligação entre as células que cobrem os eletrodos. Quando as células são estimuladas, as alterações na morfologia celular alteram a impedância. Os dados gerados são a impedância versus o tempo (Figura 6). Isto torna possível avaliar o momento exato e o *time-course* da ruptura da BE.

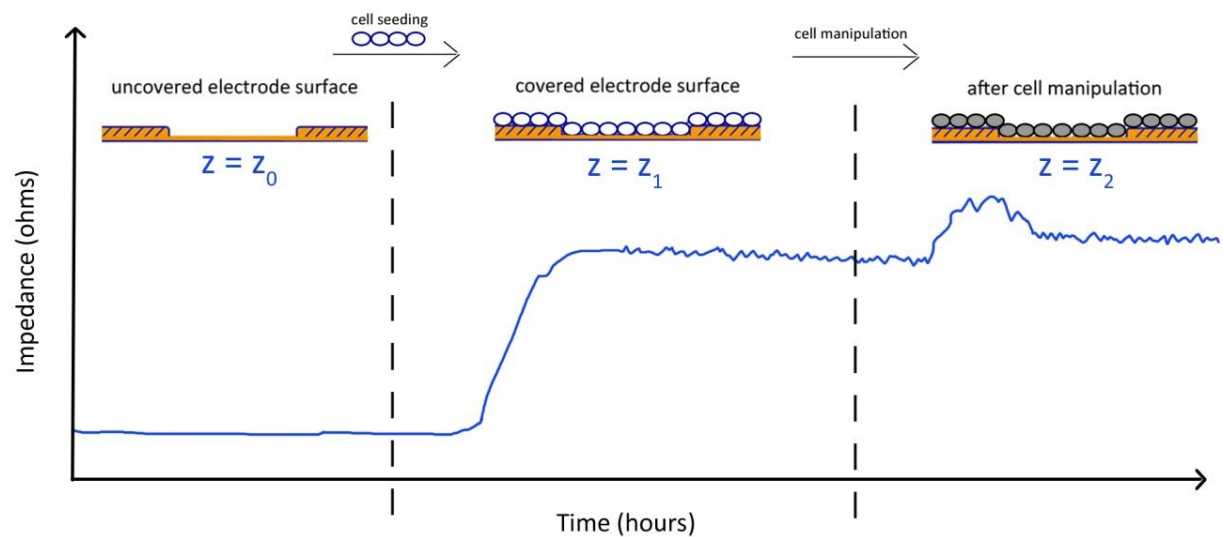


Figura 6. Funcionamento da leitura de impedância pelo ECIS®. Ilustração dos traços de impedância gerados pelo ECIS ao longo do tempo. Fonte: Applied Biophysics (brochura do instrumento ECIS)

Para os experimentos utilizando a metodologia ECIS, as HUVECs ($2,5 \times 10^5$ células / poço) foram cultivadas nas placas ECIS de oito poços revestidas com fibronectina (8WE10, Ibidi, München, Alemanha) 48 horas antes do experimento. Os experimentos foram realizados em poços nos quais a resistência elétrica da monocamada de células endoteliais tinham atingido um platô, indicativo de confluência. As HUVECs confluentes foram submetidas ao *serum starvation* (condição reduzida de suplementos e fatores de crescimento para que as células diminuam sua taxa metabólica) em meio EBM-2 suplementado com soro fetal bovino a 1% (meio *starving*) antes da estimulação. Em seguida, as HUVECs foram estimuladas como soro ou heme e a TEER foi monitorada pelo menos por 6 horas (Figura 7).

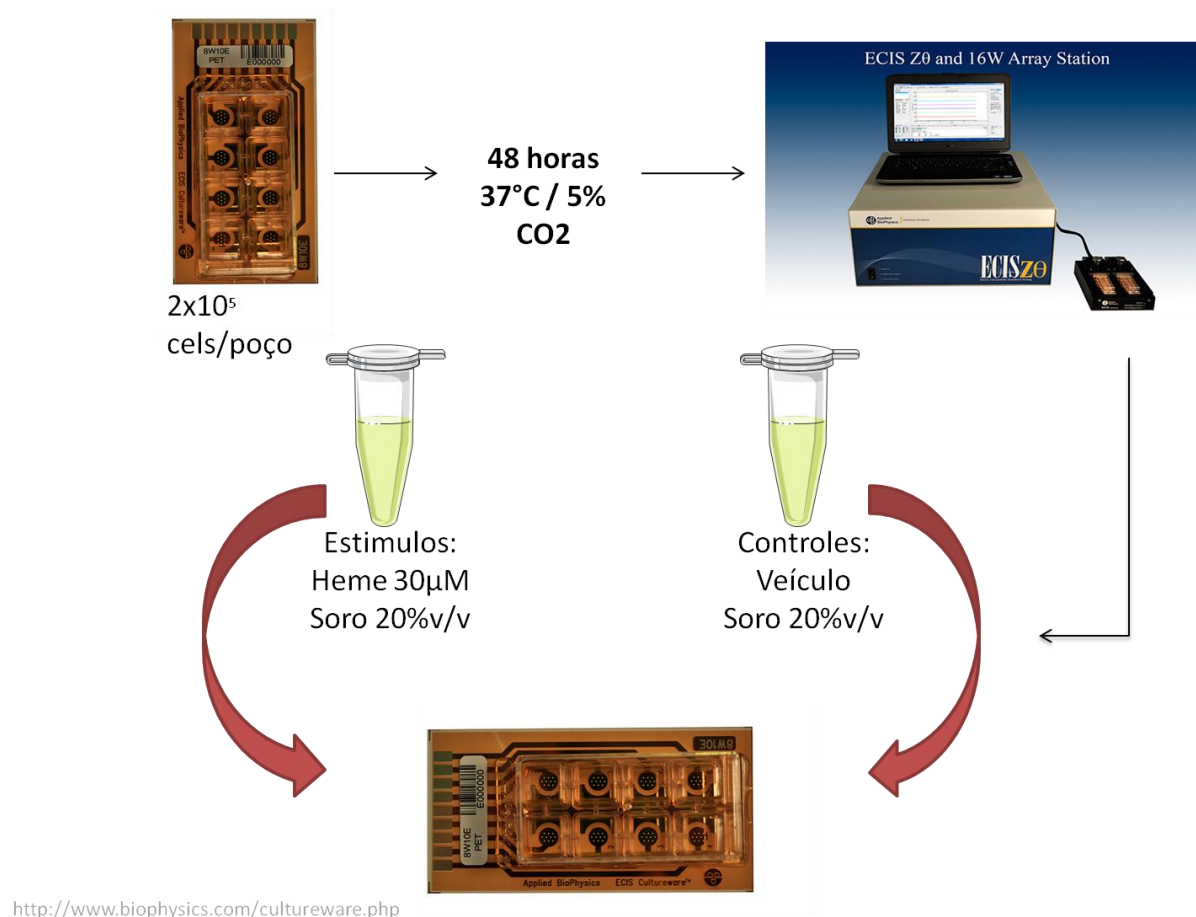


Figura 7. Metodologia ECIS® para avaliação da quebra da BE. Ilustração da metodologia ECIS. As células foram semeadas na concentração 2×10^5 células/poço, incubadas 48 horas a 37°C/5% de CO₂. Os eletrodos foram então conectados ao equipamento e as células mantidas em meio suprimido de fator de crescimento por 2 horas. Os respectivos estímulos foram adicionados e as mudanças na resistência transendotelial foram acompanhadas por no mínimo 6 horas.

A porcentagem de aumento máximo de permeabilidade induzida pelos estímulos foi calculada tendo em conta que a resistência normalizada média (RN) para um eletrodo ECIS sem células ou com células totalmente contraídas (permeabilidade máxima) é de 0,35, enquanto as monocamadas confluentes de controle não tratadas produziram um valor médio da RN de aproximadamente 1,00. Assim, a porcentagem de redução na resistência (%TEER) foi calculada aplicando a fórmula $[(RN \text{ células não estimuladas} - RN \text{ estimuladas}) / 0,75] \times 100$.

3.9 Imunofluorescência e Microscopia Confocal

As HUVECs foram cultivadas até confluência por no mínimo 48 horas em lamínulas de vidro de microscopia pré-revestidas com fibronectina, mantidas durante 2 horas em meio *starving* e então estimuladas com soro (20% v / v) durante 6 horas ou heme durante 30 minutos. Em seguida, as células foram fixadas em formalina tamponada durante 20 min, lavadas 3 vezes com PBS e tratadas com glicina 10 mM durante 5 min para eliminar os grupos aldeído provenientes da formalina. As células foram então permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100, lavadas 3 vezes com PBS e bloqueadas com albumina de soro bovino à 3% em PBS durante 15 min.

As lamínulas foram então incubadas durante 30 minutos com anticorpo monoclonal anti-VE-caderina a 37 ° C, lavadas 3 vezes em PBS e incubadas por 30 minutos a 37 ° C com anticorpo secundário conjugado com Alexa fluor 555 ou 488, lavadas 3 vezes com PBS e incubadas por mais 30 minutos a 37 ° C com faloidina conjugada com Alexa fluor 658 para detectar os filamentos de actina. Após incubação com a faloidina as lamínulas foram lavadas novamente com PBS e montadas em lâminas utilizando-se o meio de montagem para fluorescência (Fluoromont G[®]).

As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando-se a objetiva de 63x de imersão em óleo. As lacunas intercelulares (GAPs) em monocamadas confluentes foram quantificadas utilizando o software Image J. Foram quantificadas dez imagens contendo cerca de vinte células por condição e em três experimentos diferentes. O contraste da imagem foi ajustado semi-automaticamente, de modo que regiões na monocamada confluyente que não produziram sinal em todos os canais de fluorescência foram tomadas como áreas vazias ou lacunas intercelulares e selecionadas através da criação de um limite. A porcentagem de áreas vazias em relação à área total da imagem foi calculada.

3.10 Western Blot

3.10.1 *Lise e extração das proteínas*

As HUVECs foram semeadas em placas de 100 mm a uma densidade de 1×10^6 células. As células que não aderiram a placa foram removidas por lavagem com meio. Atingida a confluência as células foram estimuladas com heme 30 μ M ou veículo por 30 minutos a $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$. Após o período de incubação, as células foram lisadas com tampão RIPA suplementado com coquetel inibidor de protease. Os lisados celulares foram centrifugados a 12000g por 20 minutos à 4°C e os sobrenadantes foram aliquotados e submetidos a técnica de Bradford para quantificação das proteínas (Figura 8).

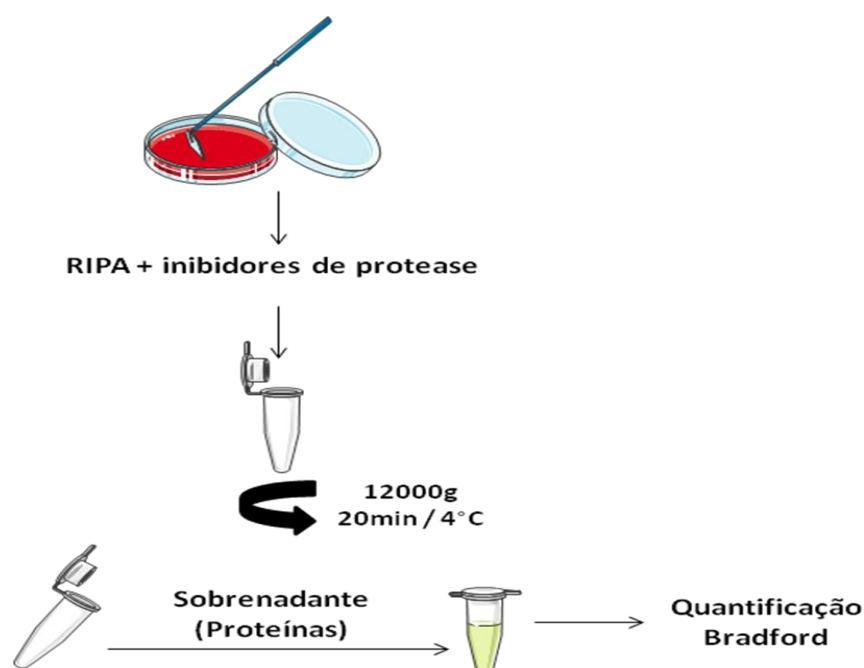


Figura 8. Exemplificação da técnica de extração de proteínas para Western Blot. Após o tratamento as células foram lisadas com tampão de lise RIPA suplementado com inibidores de proteases. O lisado celular foi então submetido à centrifugação para separar as proteínas (sobrenadante) dos restos celulares (pellet). As proteínas foram então quantificadas pela técnica de Bradford.

3.10.2 Eletroforese e transferência

Após a quantificação, as amostras foram fervidas (95°C/5min) para desnaturar as proteínas e então 30µg de proteína foram submetidas à eletroforese em gel bis-acrilamida (8%) em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca). As proteínas foram então transferidas para membrana de nitrocelulose (0,45µ) em dispositivo de eletrotransferência semi-seco sob voltagem constante de 20 V durante 1 hora. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com solução salina tamponada de TBS-T (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl e 0.02% Tween 20) e 5% de BSA, durante 1 hora em temperatura ambiente, para reduzir a ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas. As membranas foram então incubadas por 12 horas à 4°C com anticorpos específicos (Tabela 2) diluídos em tampão de bloqueio. As membranas foram lavadas 3 vezes em TBS-T e incubadas com anticorpo secundário conjugado à HRP (*Horseradish peroxidase*) durante 1 hora em temperatura ambiente. O sistema de revelação usado foi o baseado em quimioluminescência, de acordo com as instruções do kit *westar sun ECL substrates for Western Blotting* (Cyanagen, Italy), detectado pelo equipamento UVItec Alliance (UVItec, Cambridge, UK). A quantificação das intensidades de sinal foi realizada utilizando o software ImageJ e normalizadas para o controle de carregamento (GADPH) e controle não-tratado (veículo) (Figura 9).

Tabela 2. Anticorpos utilizados para Western Blot

Anticorpo	Fabricante e número de catálogo	Animal em que foi produzido	Concentração utilizada
Anti-VEC	Cell Signaling 2500S	Coelho	1:1000
Anti-VEC-phosfo Y731	Sigma SAB4301448	Coelho	1:1000
Anti-GADPH	Santa Cruz SC-137179	Camundongo	1:5000

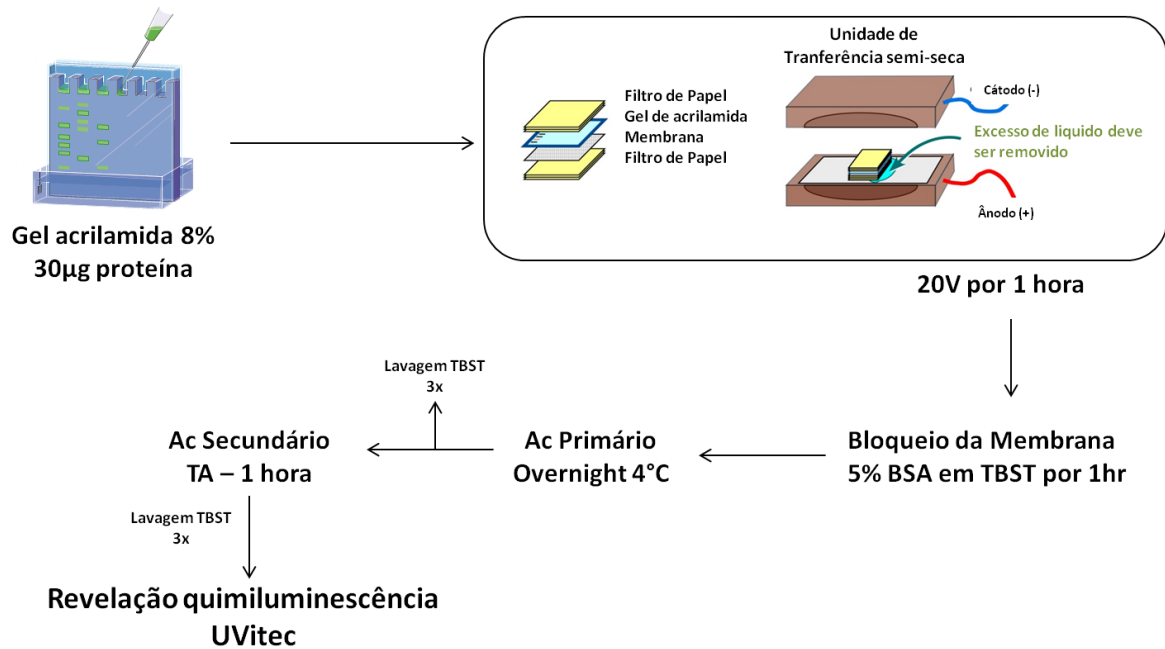


Figura 9. Eletroforese e eletrotransferência de proteínas. Em gel de acrilamida 8%, 30µg de proteínas foram carregadas e submetidas à eletroforese em voltagem crescente com início em 40V e término em 120V em um período de 3 horas. As proteínas foram então transferidas para membrana de nitrocelulose com poro de 0,45µ através de unidade de transferência semi-seca em voltagem constante de 20V por 1 hora. A membrana foi então bloqueada e incubada com os anticorpos de interesse e por fim revelada por quimioluminescência no equipamento UVitec, onde as imagens das bandas foram capturadas.

3.11 Biotinilação da superfície celular

As HUVECs foram semeadas na densidade de 20.000 células/cm² em placas de 6 poços no mínimo 48 horas antes do experimento. Após atingirem confluência foram deixadas em meio *starving* durante 2 horas a 37°C. Em seguida as células foram estimuladas com heme (30µM), veículo e VEGF-165 (50ng/ml) (controle positivo), e a internalização foi permitida por 30 minutos a 37°C. As proteínas da membrana celular foram então biotiniladas utilizando a biotina EZ-Link Sulfo-NHS (Thermo Scientific). Em seguida as células foram lisadas com tampão de lise *pull-down* (TBS-T e 10 mM de EDTA) suplementado com coquetel de inibidor de

protease. Os lisados foram centrifugados a 4°C durante 5 minutos a 16000 g e 40µl do sobrenadante foi aliqotado para controle do lisado total (LT). O sobrenadante remanescente foi incubado com esferas de Streptadivina-Agarose (Thermo Scientific) para o *pull-down* da biotina. As esferas foram lavadas 3 vezes em tampão de lise *pull-down*, fervidas durante 5 minutos em tampão de amostra de Laemmli e então submetidas a eletroforese de proteínas e western blot (Figura 10).

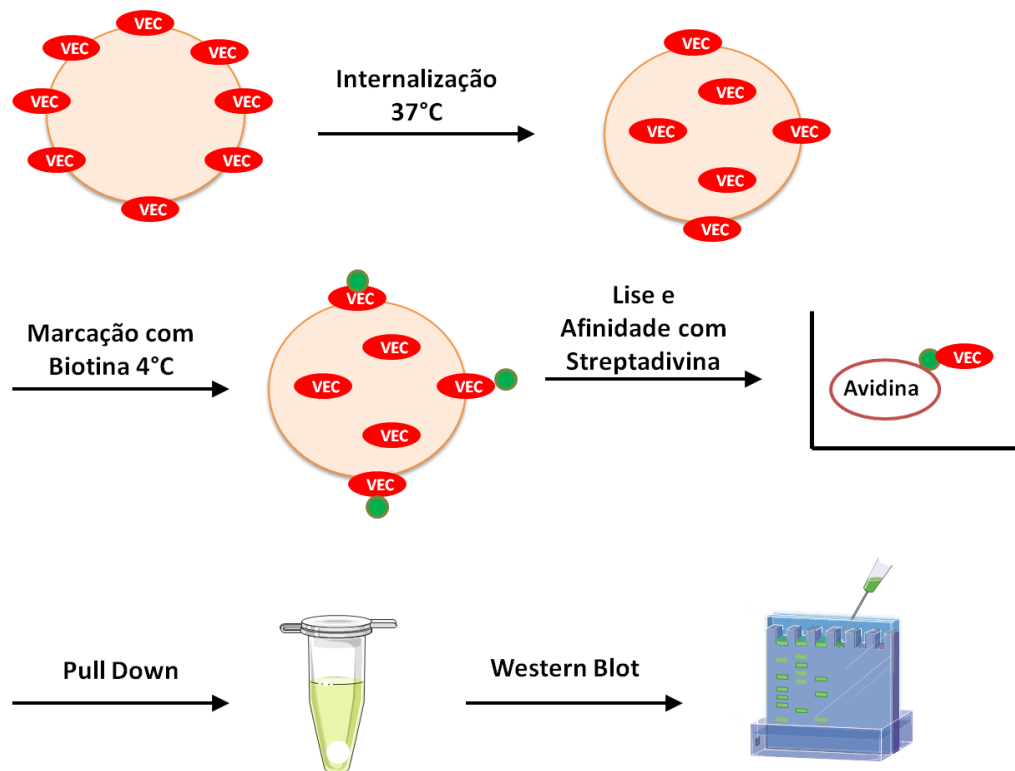


Figura 10. Princípio da técnica de biotinilação da superfície celular. As células são estimuladas e incubadas a 37°C para permitir a internalização. Após internalização, as células são rapidamente transferidas a 4°C para parar os processos endocíticos e então são biotiniladas a 4 ° C para marcar exclusivamente as proteínas remanescentes na membrana. As proteínas biotiniladas são isoladas por cromatografia de afinidade com esferas de streptadivina e então submetida à alta centrifugação (*pull-down*) para que as esferas ligadas às proteínas de interesse permaneçam do pellet; então as proteínas de interesse são detectadas por imunotransferência.

3.12 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi mensurada com o reagente 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), (Sigma®). As HUVECs foram semeadas na densidade de 1×10^4 células por poço distribuídas em placas de 96 poços em meio EBM-2 durante 48 horas e então mantidas em meio *starving* (1% FBS) durante 2 horas. O meio então foi trocado para EBM-2 contendo diferentes concentrações de heme (10 uM, 30 uM, 50 uM, 70 uM e 100 uM) ou veículo em triplicata. Após 30 minutos de tratamento adicionou-se a cada poço 100 µl de solução de MTT (5 mg/ml) e as células foram incubadas novamente por mais 3 horas. Em seguida, adicionou-se 100 µL de uma solução de isopropanol 90% e DMSO para solubilização dos cristais de formazan. As placas foram agitadas durante 5 minutos e a absorbância correspondente a cada amostra foi medida em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 570 nm.

3.13 Análise Estatística

Para comparação entre grupos com variáveis contínuas foram utilizados o teste de Mann-Whitney ou Student test t, de acordo com a distribuição da variável, (não-Gaussiana ou Gaussiana, respectivamente). Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste de Fisher. As correlações foram avaliadas através do coeficiente de correlação de Spearman ou Pearson. Um valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism versão 7 (GraphPad Prism Software Inc. San Diego, Califórnia, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Características dos pacientes

Durante o período do estudo, um total de 18 pacientes com diagnóstico de choque séptico foram incluídos. Destes, 16 (88,9%) foram incluídos dentro de 72 horas do diagnóstico de choque séptico e, nos 2 pacientes restantes, o choque séptico foi diagnosticado 10 e 11 dias antes da coleta da amostra, respectivamente, mas ambos os pacientes ainda apresentavam critérios de choque no momento da coleta da amostra.

Dentre os 18 pacientes, 13 (72,2%) evoluíram a óbito em 28 dias. Co-morbidades, incluindo Doença Enxerto Contra Hospedeiro Aguda, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, Insuficiência Respiratória Crônica, Insuficiência Cardíaca e Hipertensão Arterial estavam presentes em 13 pacientes, dos quais 12 foram a óbito. A identificação do foco foi realizada através de exames de imagem e manifestação clínicas e do agente infeccioso (n=34), através de hemoculturas e culturas de lesões de pele e seios da face. Pulmão, pele, seios da face e abdômen foram os sítios envolvidos. Foram detectados bactérias gram-negativas (*A. baumannii*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*), bactérias gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. viridans*) e fungos (*Aspergillus* e *Fusarium*). As características adicionais dos pacientes são apresentadas na Tabela 3.

Os pacientes que foram a óbito apresentaram mais comorbidades ($P = 0,007$), menor contagem de plaquetas ($P = 0,01$) e maiores níveis de bilirrubina ($P = 0,05$). E como esperado tiveram um escore SOFA mediano mais elevado (13, intervalo 10-18) do que os pacientes sobreviventes (10, intervalo 4-17). Todas as mortes foram atribuídas a complicações de choque séptico. As diferenças entre os grupos de pacientes sobreviventes ($n = 5$) e óbitos ($n = 13$) são apresentadas na Tabela 4.

Onze indivíduos saudáveis foram incluídos como controles, com uma idade média de 32 anos (intervalo: 24-52) e uma proporção de gênero de 5 homens e 8 mulheres.

Tabela 3. Características dos pacientes

	Pacientes (n=18)
Demográficos	
Idade – mediana (min-máx)	59 (27-85)
Sexo (Homem:Mulher)	10 : 8
Comorbidades (%) *	
Nenhuma	5 (27)
Câncer	7 (38)
Insuficiência cardíaca	2 (11)
Hipertensão arterial	1 (5)
Insuficiência respiratória crônica	4 (22)
Outras	5 (27)
Dados Laboratoriais – mediana (min-máx)	
Contagem de células brancas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	9.95 (0,01 – 25,87)
Hemoglobina (g/dL)	9,85 (4,80 – 14,70)
Creatinina (mg/dL)	1,54 (0,56 – 7,30)
Bilirrubina (mg/dL)	0,55 (0,18 – 4,80)
Contagem de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	90 (0,46 – 43,7)
Ventilação mecânica e escore de severidade	
Ventilação mecânica na admissão – sim (%)	18 (100)
Escore SOFA na admissão – mediana (min-máx)	13 (4 – 18)
Foco da infecção (%)	
Abdominal	1 (5)
Pulmonar	10 (55)
Pele	3 (16)
Outros	1 (5)
Desconhecido	3 (16)

SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; *8 pacientes tiveram mais de uma comorbidade; outras comorbidades incluíram SIDA, malária, diabetes, doença do enxerto contra o hospedeiro e doença de Chagas.

Tabela 4. Características dos subgrupos

	Resolução do choque séptico (n=5)	Óbito (n=13)	P
Gênero (homem :mulher)	5 : 0	5 : 8	0,0359**
Idade (mediana, min-máx)	66 (34 – 72)	59 (27 – 85)	NS*
Comorbidades (presente: ausente)	1 : 4	12 : 1	0,0077**
Contagem das células brancas (x10³/µl) (mediana, min-máx)	9,01 (5,46 – 20,29)	10,88 (0,01 – 25,87)	NS*
Hemoglobina (g/dL) (mediana, min-máx)	11,50 (8,60 – 12,50)	9,00 (4,80 – 14,70)	NS*
Creatinina (mg/dL) (mediana, min-máx)	1,04 (0,66 – 5,19)	2,06 (0,56 – 7,30)	NS*
Bilirrubina (mg/dL) (mediana, min-máx)	0,42 (0,18 – 1,40)	2,07 (0,29 – 4,80)	0,0281*
Contagem de plaquetas (x10³/µl) (median, min-máx)	174,00 (0 – 437)	53,00 (9 – 152)	NS*
SOFA (median, min-máx)	10 (4 – 17)	13 (10 – 18)	0,0515
Cultura positiva*** (sim:não)	1 : 4	6 : 7	NS**

SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; * Teste de Mann-Whitney; **Teste de Fisher; ***Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia gladioli*. Gram-positivas: *Staphylococcus*. Fungos: *Fusarium*. Protozoário: *Plasmodium falciparum*

4.2 Análise funcional e morfológica da barreira endotelial

O estímulo com soro humano provocou uma redução transitória da TEER na monocamada endotelial como ilustrado na figura 11.

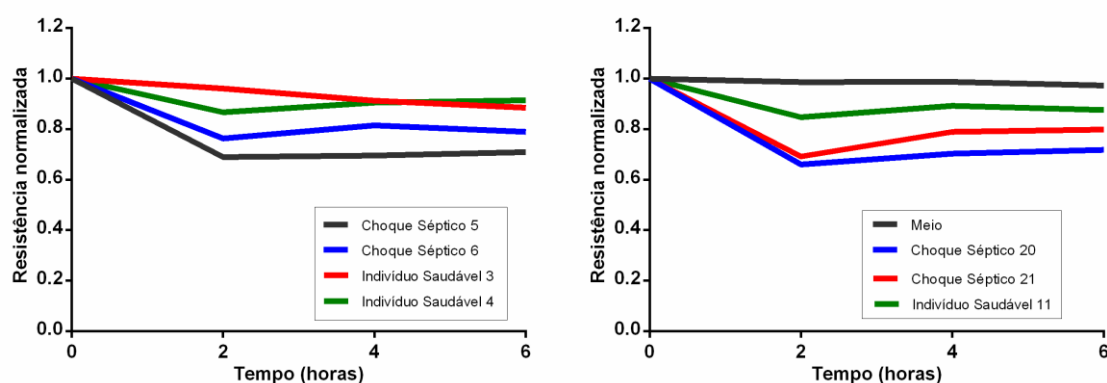


Figura 11. Traço representativo da detecção de impedância pelo ECIS® após estímulo com soro humano. Alteração da resistência normalizada na monocamada endotelial em relação ao tempo. Tempo zero representa o momento da adição do soro de pacientes com choque séptico e soro de indivíduos saudáveis.

As HUVECs incubadas com soro de indivíduos saudáveis quase recuperaram os valores iniciais da TEER 2 horas após a exposição (diminuição média de TEER de $13,75\% \pm 14,76\%$), enquanto que na presença de soro de pacientes com choque séptico a TEER reduziu em $23,41 \pm 14,61\%$). A diferença entre as células expostas ao soro de pacientes com choque séptico e os indivíduos saudáveis alcançaram significância estatística após 4 e 6 horas do estímulo ($21,52 \pm 12,71$ vs $10,93 \pm 10,69$; $P = 0,03$; $22,08 \pm 13,24$ vs. $12,32 \pm 9,86$; $P = 0,04$, respectivamente) (Figura 12). Os experimentos foram realizados em duplicata, e em pelo menos 3 momentos independentes.

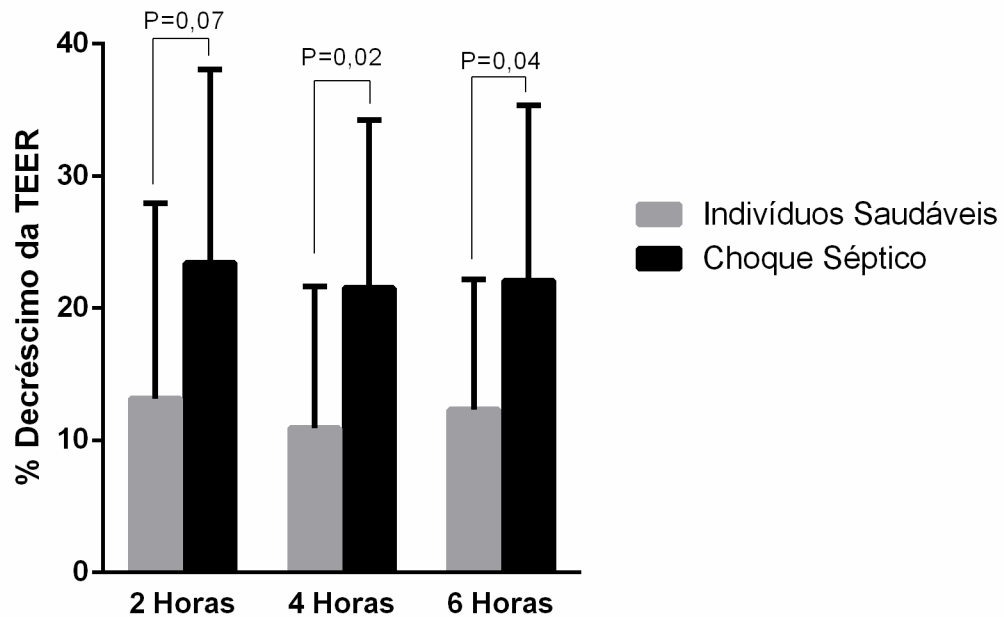


Figura 12. Porcentagem de decréscimo da resistência transendotelial induzida pelo soro de pacientes com choque séptico e indivíduos saudáveis. Alteração da resistência transendotelial após 2 horas, 4 horas e 6 horas da adição do soro. Os grupos foram analisados pelo Student teste t. Valores apresentados como média \pm desvio padrão. Soro de pacientes com choque séptico causou uma maior alteração na função barreira do que soro de indivíduos saudáveis.

Não foi observada diferença entre os valores da TEER dos pacientes sobreviventes versus não sobreviventes (Figura 13).

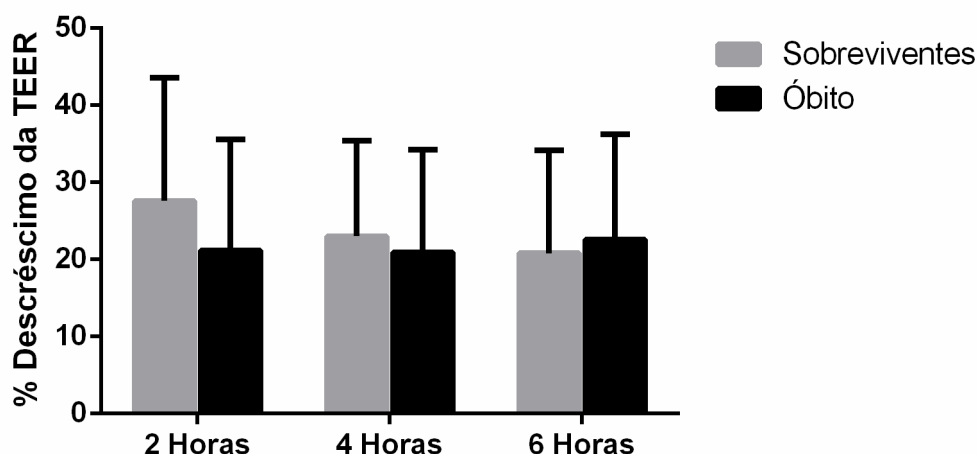


Figura 13. Porcentagem de decréscimo da resistência transendotelial entre os subgrupos de pacientes. Alteração da resistência transendotelial na monocamada de células endoteliais 2 horas, 4 horas e 6 horas da adição do soro, comparando amostras de pacientes com choque séptico que sobreviveram e amostras de pacientes com choque séptico que foram a óbito. Os grupos foram analisados pelo teste t de Student. Valores apresentados como média \pm desvio padrão. Ambos os grupos causaram disfunção na barreira endotelial, porém não houve diferença entre os grupos.

Consistente com a perda da TEER, a análise confocal das células endoteliais incubadas com soro revelou um aumento de lacunas intercelulares detectadas pelos marcadores de junção VE-caderina e F-actina (Figura 14A). De forma similar aos ensaios funcionais, a extensão das lacunas intercelulares foi significativamente menor nas células incubadas com soro de indivíduos saudáveis quando comparadas com soro de pacientes com choque séptico ($0,265 \pm 0,247\%$ vs $0,950 \pm 0,342\%$, respectivamente, $P = 0,01$) (Figura 14B).

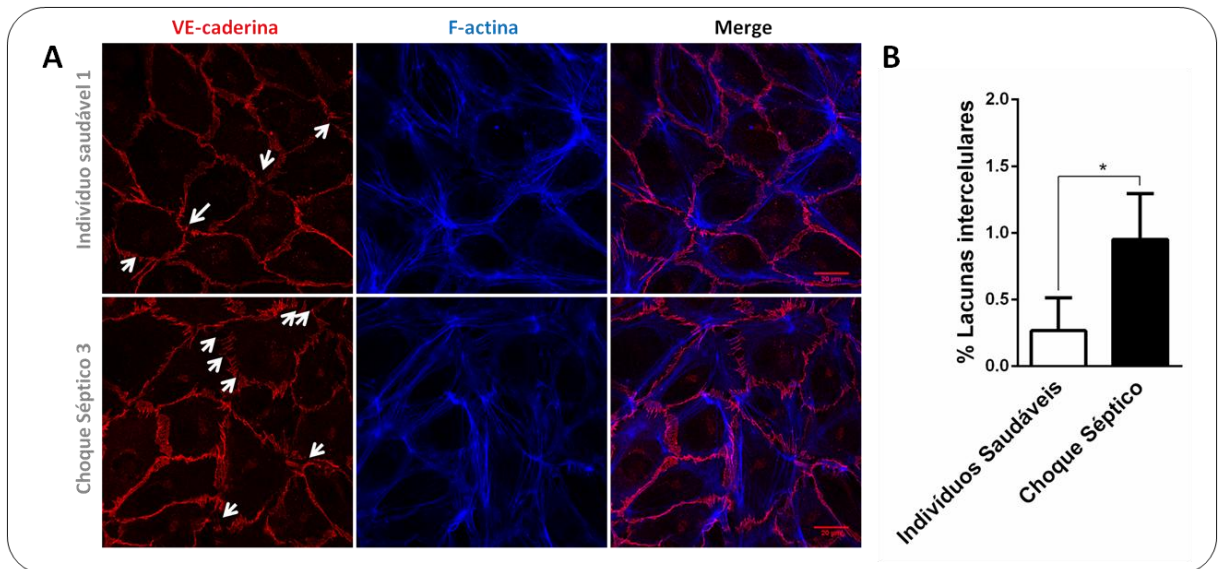


Figura 14. Efeito do soro humano na morfologia das células endoteliais. Células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) foram tratadas durante 6 h com soro de um indivíduo saudável e de paciente com choque séptico e marcadas para os marcadores de junção célula-célula VE-caderina e filamentos de actina (F-actina). As setas indicam as lacunas intercelulares (A) O processamento semi-automatizado das imagens identificou as lacunas intercelulares que foram quantificadas relativo à área total da monocamada de células. Teste de Mann-Whitney; *p = 0,01.

4.3 Níveis séricos do VEGF-A e Ang-2 e sua associação com a gravidade da sepse e a permeabilidade endotelial

A fim de explorar os mecanismos de aumento da permeabilidade endotelial induzida pelo soro dos pacientes, mensuramos os níveis séricos de VEGF-A e Ang-2, que são mediadores clássicos da quebra da barreira endotelial durante a angiogênese e no choque séptico. Como esperado, os níveis de Ang-2 foram marcadamente maiores nos pacientes com choque séptico ($14299,0 \pm 4294,0$ pg / ml) em relação aos indivíduos saudáveis ($2471,0 \pm 727,3$ pg / ml; $P < 0,0001$) (Figura 15A). Porém, em nossa população, não foi detectada diferença entre os níveis de VEGF-A entre os grupos (Figura 15B).

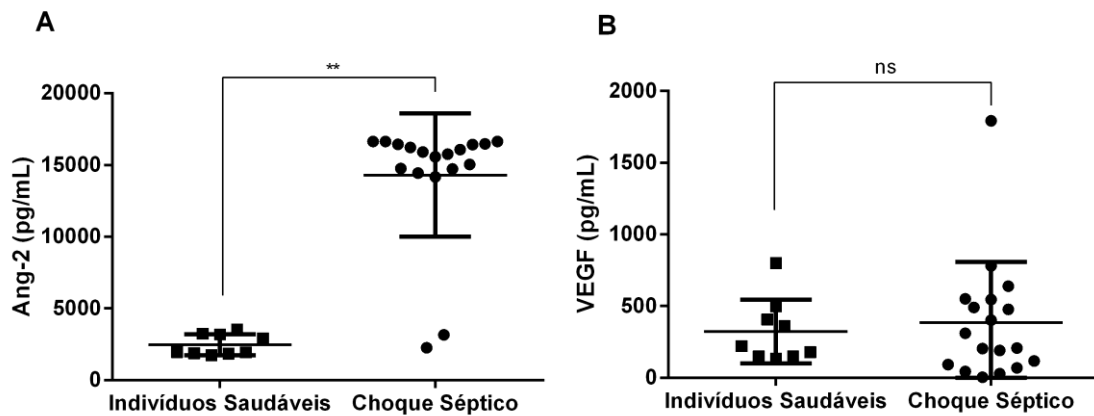


Figura 15. Níveis séricos dos mediadores clássicos envolvidos na quebra da barreira endotelial. *Scatter plot* representando as concentrações séricas de Angiopietina-2 (A) e VEGF-A (B) em pacientes com choque séptico (n= 18) e indivíduos saudáveis (n=9). Teste de Mann- Whitney; **p<0,0001; ns: não significativo.

Para explorar a potencial associação dos níveis de VEGF-A e da Ang-2 com a gravidade da sepse e como possível modulador da quebra da BE, nós avaliamos a correlação entre os níveis destes marcadores com o escore de gravidade da sepse e com a porcentagem de decréscimo do TEER (%TEER).

Não pudemos observar uma correlação entre os níveis de Ang-2 e a diminuição de TEER em qualquer momento (Tabela 4). Em relação ao VEGF-A, também não se correlacionou com a gravidade da sepse, porém, correlacionou-se com a magnitude da ruptura da barreira endotelial (%TEER) após 2 (R = 0,43, P = 0,02) e 4 horas (R = 0,39, P = 0,05) de incubação (Tabela 5).

Tabela 5. Correlação dos níveis de VEGF e Ang-2 com a gravidade da sepse e a permeabilidade endotelial

	%TEER 2h	%TEER 4h	%TEER 6h	SOFA escore
VEGF-A	r = 0,431 P = 0,024	r = 0,387 P = 0,046	r = 0,157 P = ns	r = -0,048 ns
Ang-2	r = 0,141 P = ns	r = 0,214 P = ns	r = 0,286 P = ns	r = 0,431 0,07

4.4 Níveis séricos do heme e seu papel na barreira endotelial

O heme extracelular é um mediador inflamatório que em modelos animais parece participar da fisiopatologia da sepse grave. Além disso, foi recentemente demonstrado que a hemoglobina e o heme livres participam na fisiopatologia da síndrome respiratória aguda experimental e humana (46,85). Em nosso estudo, os níveis médios de heme em pacientes com choque séptico foram de 33,32 μ M, comparados a 22,48 μ M em indivíduos saudáveis ($P = 0,07$), revelando uma tendência estatística de diferença (Figura 16). De fato, quando ampliamos o número de sujeitos por grupo, incluindo outros pacientes com sepse de nossa base de dados, a diferença torna-se significativa (dados não mostrados por incluírem resultados de indivíduos que não realizaram a análise funcional). É importante ainda destacar que estes valores de heme encontram-se na mesma ordem de grandeza daqueles observados em pacientes com doença falciforme, o que permite caracterizar o choque séptico como uma condição de fato associada a níveis elevados de heme livre.

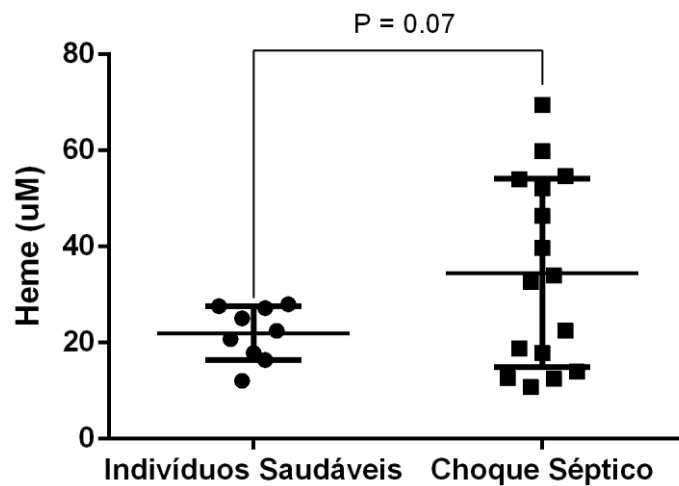


Figura 16. Níveis séricos de heme nos pacientes com choque séptico e indivíduos saudáveis. Níveis totais de heme em pacientes com choque séptico (n = 16) e indivíduos saudáveis (n = 9) (A). As barras horizontais representam valores médios; *Student* teste t.

4.5 Heme e a gravidade da sepse

Além de mais elevados em pacientes com choque séptico, os níveis de heme correlacionaram-se com o escore de severidade da sepse SOFA ($r = 0,57$, $P < 0,05$) (Figura 17 A) e com a permeabilidade endotelial, medida pelo ECIS (% TEER) após 6 horas de incubação ($r = 0,41$, $P = 0,05$) (Figura 17 B). Estes resultados sugerem que o heme livre pode ter um papel relevante na fisiopatologia da quebra da BE e em outros elementos da fisiopatologia do choque séptico.

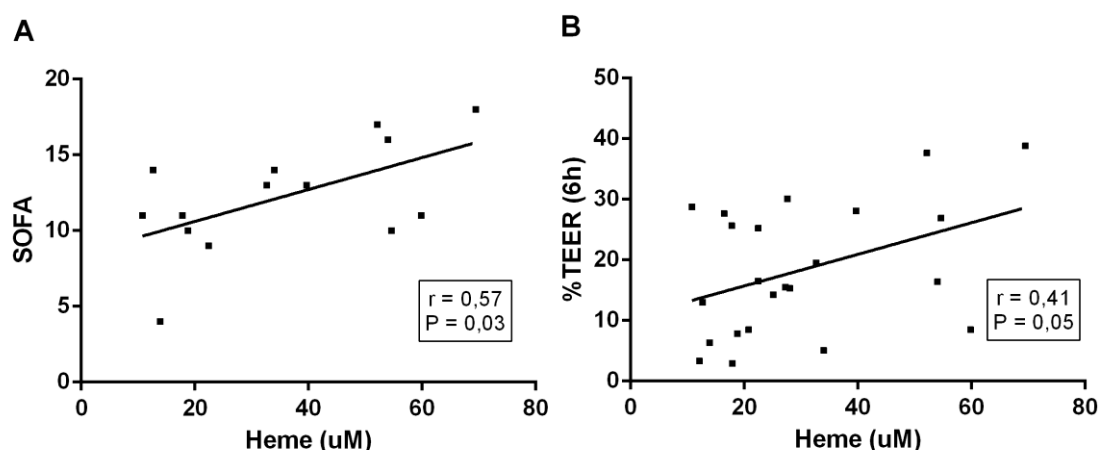


Figura 17. Correlação dos níveis de heme com o escore de gravidade na sepse e a permeabilidade endotelial. Análise de correlação entre o escore de avaliação de disfunção orgânica na sepse (SOFA) (A) e a permeabilidade endotelial (% TEER) (B). Correlação de Pearson (r).

4.5.1 Heme induz aumento da permeabilidade endotelial em monocamada de HUVEC

Diante das evidências de que o heme livre possui um papel importante na fisiopatologia do choque séptico, avaliamos os efeitos do heme sobre a permeabilidade vascular, com o mesmo sistema utilizado nas amostras clínicas. O heme livre promoveu uma queda na resistência elétrica logo após sua adição nas células endoteliais (Figura 18). Quando comparado com o veículo, o heme induziu uma perda significativamente maior da função da BE, que foi detectada logo nos primeiros 30 minutos após o estímulo (% TEER veículo vs heme: $9,76 \pm 8,54$ vs. $53,60 \pm 16,19$, $P = 0,0143$) e persistiu após 1 e 2 horas após o estímulo ($8,77 \pm 6,82$ vs. $38,59 \pm 6,84$, $P = 0,0059$; $9,47 \pm 10,10$ vs. $33,07 \pm 3,59$, $P = 0,0189$; respectivamente). Após 4 horas, as células endoteliais já começaram a retornar seu estado inicial ($13,51 \pm 13,98$ vs. $32,93 \pm 9,342$, $P = 0,1160$). Estes dados são ilustrados na figura 19. Os experimentos foram realizados em duplicata, e em pelo menos 3 momentos independentes. Além disso, foram usadas diferentes

preparações de heme, em diferentes veículos, com resultados consistentes.

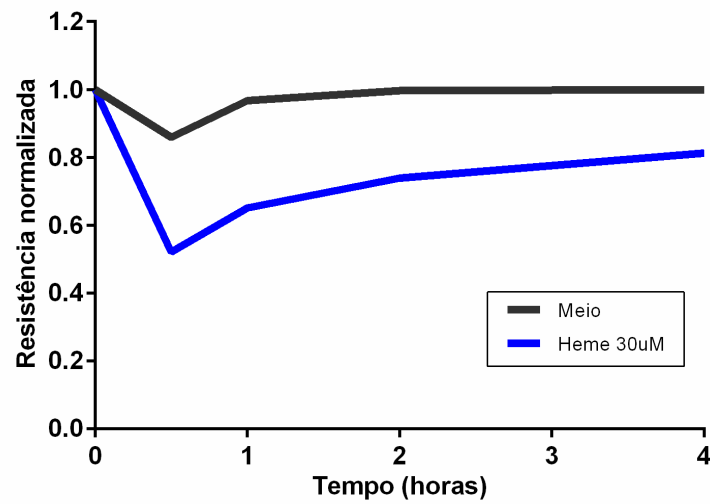


Figura 18. Ação do heme nas mudanças da resistência transendotelial. O tratamento com heme diminui a resistência elétrica transendotelial (TEER). Tempo zero indica o momento da adição do heme, a linha azul representa as mudanças na resistência normalizadas induzidas pelo heme e a linha preta o veículo.

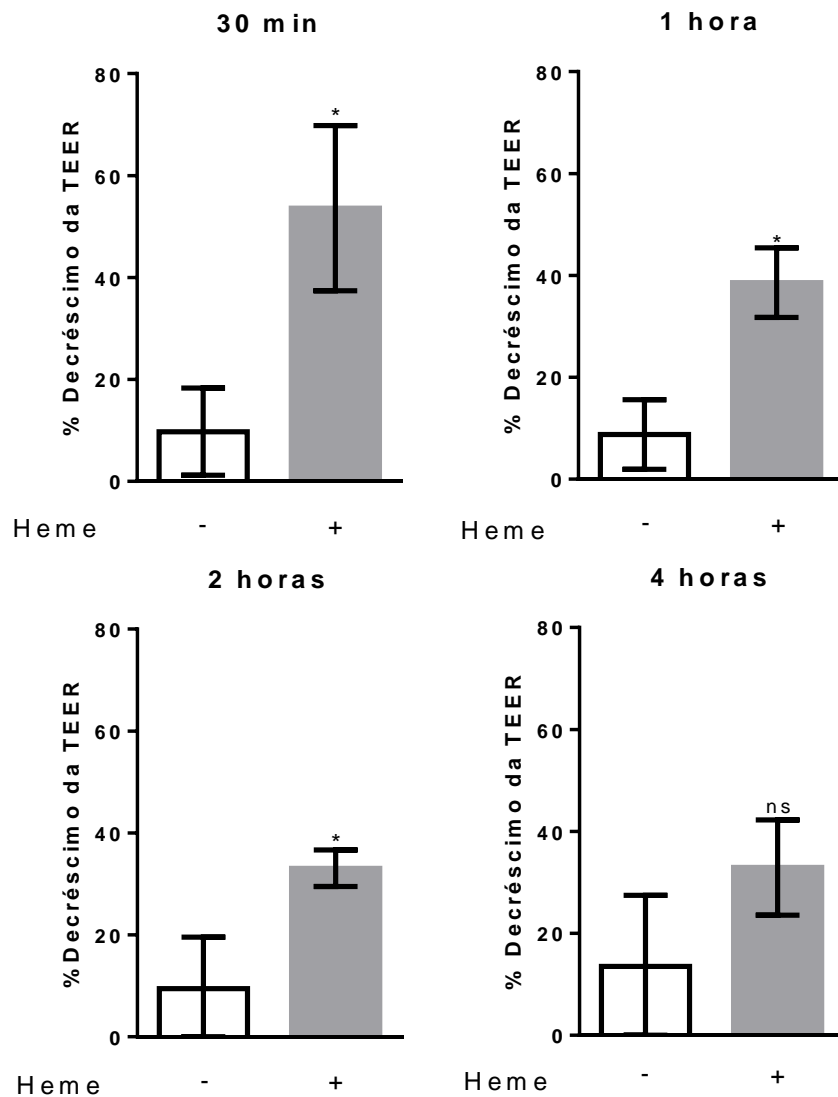


Figura 19. Heme aumenta a permeabilidade em monocamada de células endoteliais.

HUVECs semeadas nos eletrodos foram submetidas a tratamento com heme 30 μ M ou veículo durante 30 minutos. A permeabilidade foi medida através da porcentagem de decréscimo da resistência transendotelial (% TEER), 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 4 horas após estímulo com heme ou veículo. Os dados são mostrados como média \pm desvio padrão de 3 experimentos distintos. * $p \leq 0.05$; ns, não significativo.

Para avaliar as alterações morfológicas causadas pelo heme livre, desafiamos as HUVECs com heme (30 μ M) ou veículo durante 30 min. Em concordância com a porcentagem de decréscimo da TEER, a análise confocal

mostrou o aumento de lacunas intercelulares nas células tratadas com heme, detectadas por coloração com VE-caderina e F-actina (Figura 20A), onde a porcentagem de lacunas intercelulares nas células tratadas com heme foram significativamente mais extensas ($5,41\% \pm 4,639$) quando comparadas com o veículo ($0,643\% \pm 0,434$; $P = 0,05$) (Figura 20B).

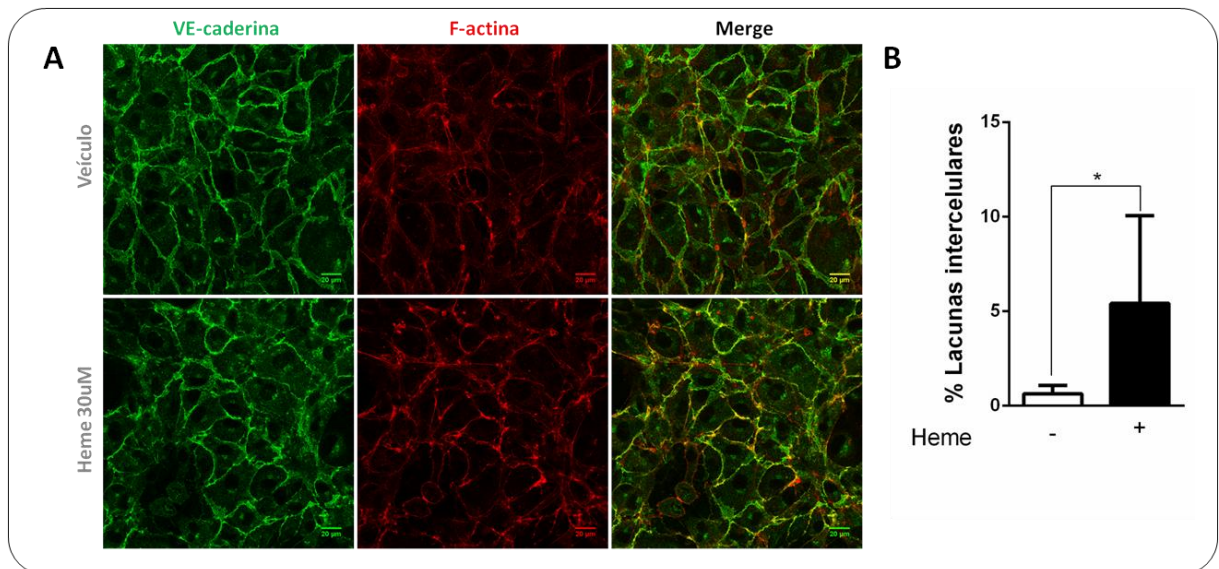


Figura 20. Heme induz modificação na arquitetura das junções aderentes. As HUVECs foram tratadas com veículo ou heme 30uM durante 30 minutos e então foram coradas para o marcador de junção célula-célula VE-caderina e para os filamentos de actina (F-actina) (B). O processamento de imagem semi-automatizado identificou as lacunas intercelulares que foram quantificadas em relação à área total da monocamada de células (B). Média \pm desvio padrão de três experimentos independentes * $P \leq 0,05$; ns, não significativo. Bar, 20 μ m.

4.5.2 Estimativa da acurácia diagnóstica dos níveis séricos de heme

A acurácia diagnóstica dos níveis de heme foi estimada usando a curva ROC na população do estudo. O valor da área sob a curva ROC dos níveis de heme foi de 0,69 (0,51-0,86; $p=0,059$), sugerindo que a acurácia diagnóstica desta medida pode ser útil em discriminar pacientes com choque séptico da população normal.

4.5.3 Análise da mortalidade por choque séptico em 28 dias

Para avaliar o risco de mortalidade, selecionamos um *cutoff* de acordo com o valor dos níveis de heme, 22,48µM foi o melhor *cutoff* identificado pela curva ROC em nossa população, prevendo a evolução para óbito com uma sensibilidade de 61,9% (95%IC=38,44-81,89%) e uma especificidade de 71,43% (95%IC=41,90%-91,61%).

Para determinar a relação entre os níveis de heme com mortalidade por choque séptico em 28 dias, foi realizada uma curva de sobrevida de Kaplan-Meier. A mortalidade no dia 28 em pacientes com níveis de heme menor que o valor do *cutoff* foi de 28% comparado à mortalidade de 85% entre os pacientes com níveis de heme maior que o *cutoff* ($p=0,0059$ pelo teste de Wilcoxon) (Figura 21)

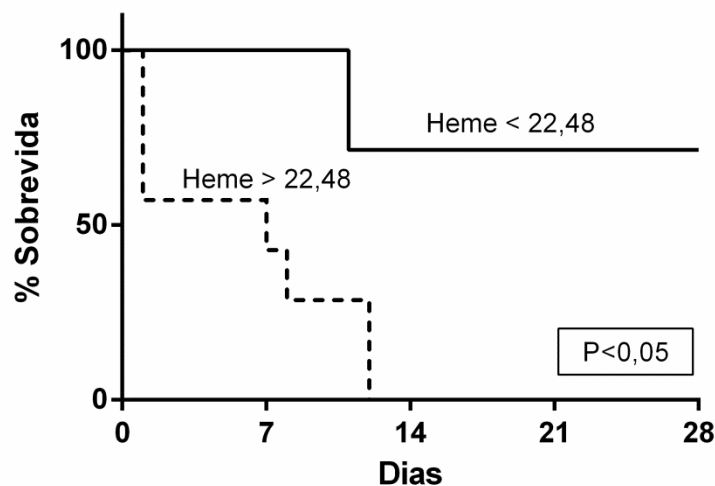


Figura 21. Sobrevida de pacientes com choque séptico de acordo com os níveis de heme estratificado pelo *cutoff*. Curva de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida de pacientes com choque séptico de acordo com os níveis totais de heme. Os valores de cada paciente foram estratificados em relação ao *cutoff* dos níveis de heme.

4.6 Heme livre na modulação das junções aderentes

4.6.1 Internalização da VE-caderina

Sabe-se que o aumento na permeabilidade vascular e a quebra da BE devido à dissociação de proteínas das junções célula-célula têm sido associados à internalização da VE-caderina em compartimentos subcelulares e subsequente sua reciclagem ou degradação (86). Analisamos, portanto, se o estímulo do heme modula a taxa de endocitose da VE-caderina através da biotinylação da superfície celular, onde após a biotinylação, permitimos a endocitose durante 30 min e então medimos os níveis de VE-caderina internalizada através da proporção de VE-caderina total e VE-caderina biotinilada, ou seja, $VEC_{\text{internalizada}} = VEC_{\text{total}} - VEC_{\text{biotinilada}}$.

De acordo com nossos dados, ainda preliminares, as células tratadas com veículo exibiram níveis relativamente baixos de VE-caderina internalizada. Os níveis de VEC internalizada foram aumentando após a estimulação com heme de uma forma dose dependente (Figura 22A). As quantificações mostraram que a adição de heme 30 μ M não resultou em um aumento da VEC internalizada comparado com células não tratadas, enquanto que o heme 100 μ M conduziu a um aumento de 1,9 vezes (Figura 22B). Foram observados efeitos semelhantes ao tratamento com 50ng/ml de VEGF-165 (5 vezes), utilizado como controle positivo.

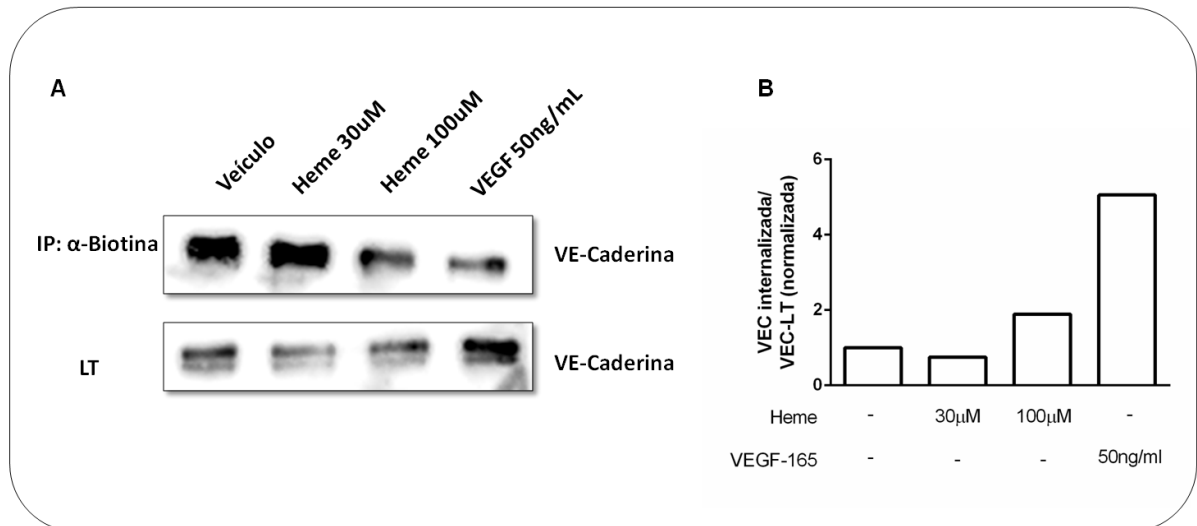


Figura 22. Heme livre na promoção da internalização da VE-caderina. As HUVECs foram tratadas com veículo, heme 30μM e 100μM e 50ng/ml de VEGF-165, utilizado como controle positivo, a endocitose foi permitida durante 30 min a 37 ° C. As proteínas de superfície das HUVECs foram então biotiniladas a 4 ° C. As proteínas biotiniladas foram submetidas a imunoprecipitação e as amostras foram transferidas como indicado. Os lisados totais (LT) representam amostras antes da precipitação. (B) Quantificação das intensidades de sinal da VE-caderina representadas em A e normalizadas para LT- VE-caderina e células de controle não tratado. Dado de um experimento.

4.6.2 Fosforilação da VE-caderina

Além da sua internalização, modificações pós-translacionais da VE-caderina também participam da regulação da permeabilidade vascular. Assim, analisamos se a transdução de sinal do heme altera o estado de fosforilação da VE-caderina. Para isso, avaliamos a fosforilação da VE-caderina no resíduo Y731, após estímulo com heme ou veículo. Após 30 min de tratamento com heme 30μM, observou-se um aumento de 1,8 vezes nos níveis de VE-caderina fosforilada, já o tratamento com heme 100μM provocou um aumento de 4 vezes, porém esse aumento não foi significativo (Figura 23 A, B). Assim, inferimos que o heme pode induzir a fosforilação de VE-caderina no resíduo Tyr731, porém mais estudos serão necessários para confirmar ou refutar este achado.

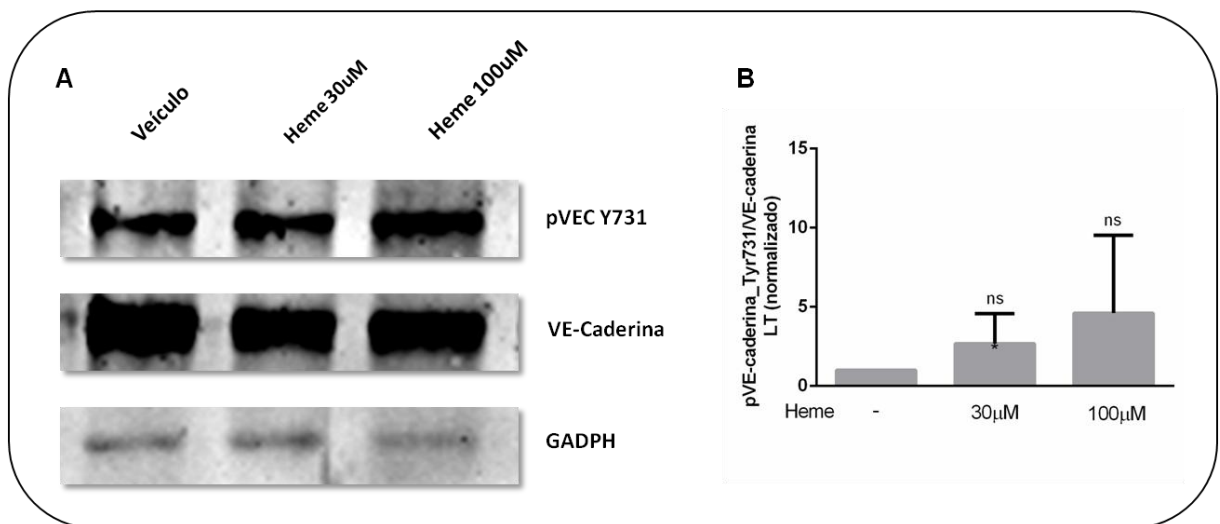


Figura 23. Fosforilação da VE-caderina induzida pelo heme. (A) As HUVECs foram tratadas com veículo, heme 30μM e 100μM durante 30 min, as proteínas foram extraídas e as amostras transferidas como indicado. (B) Quantificação das intensidades de sinal de pVE-caderina_Tyr731 representadas em A e normalizadas para VE-caderina e células de controle não tratados. Média ± desvio padrão de três experimentos independentes. ns: não significativo.

4.7 Viabilidade celular

Para excluir que o aumento da permeabilidade endotelial induzida pelo heme fosse devido a um aumento na morte celular, realizamos o ensaio de MTT para a viabilidade celular em células endoteliais tratadas com heme. Não foram observadas alterações significativas da viabilidade celular após estimulação com concentrações crescentes de heme (10, 30, 50, 70 e 100 μM) após 30 minutos (Figura 24).

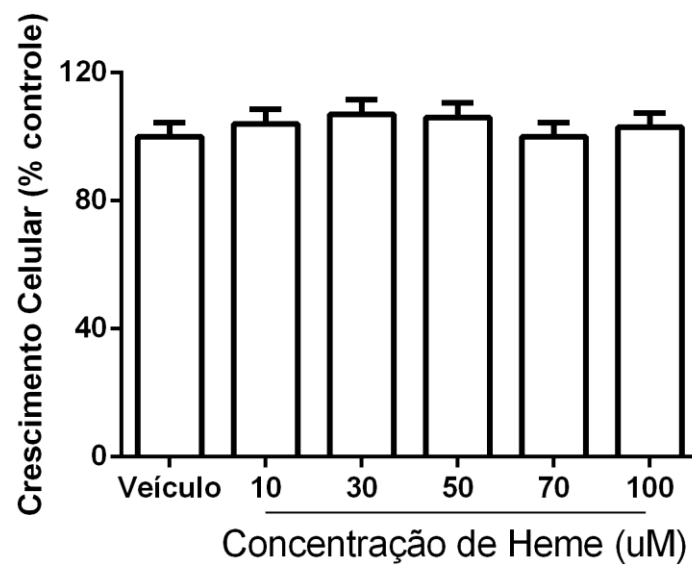


Figura 24. A viabilidade das células endoteliais não foi afetada pelo heme livre. Ensaios de viabilidade foram realizados com as HUVECs e pudemos observar que não houve uma alteração na viabilidade das células.

5. DISCUSSÃO

O aumento da permeabilidade microvascular é considerado um elemento chave na patogênese do choque séptico e um promissor alvo terapêutico para a sepse (5,87,88). No entanto, a maioria dos dados que suportam este conceito derivam de modelos animais (89–92), com dados limitados a partir de estudos em seres humanos. Além disso, não existe evidência direta sobre os mediadores responsáveis pelo aumento da permeabilidade endotelial no choque séptico humano. Os resultados mais importantes do nosso estudo foram a demonstração de que o soro de pacientes com choque séptico é suficiente para induzir alterações funcionais e morfológicas associadas à ruptura da barreira endotelial *in vitro* e que essas alterações podem ser, pelo menos parcialmente, mediadas pelo heme.

5.1 A sepse como um estado de hiperpermeabilidade vascular

O conceito clássico da fisiopatologia da sepse parte da ativação da resposta imune inata. Esta ativação resulta em uma resposta celular e molecular estereotipada, que inclui a ativação endotelial. Quando localizada e regulada, esta ativação tende a ser benéfica. Quando disseminada e sem controle de localização, pode se tornar um mecanismo de lesão mais importante que o próprio fator desencadeante. Este paradigma clássico é reconhecido há anos no contexto da sepse e, quando aplicado à ativação endotelial postula que esta ativação poderia tanto facilitar a adesão e o acesso de células do sistema imune aos tecidos infectados, quanto levar a complicações da sepse decorrentes do aumento da permeabilidade microvascular (5,16,87,91,93). Com base na observação clínica, as principais consequências deste estado de hiperpermeabilidade seriam a lesão pulmonar aguda, a hipotensão e edema tecidual. As consequências dos dois primeiros são mais óbvias. Quanto ao edema tecidual, este pode levar a acúmulo de líquido parenquimatoso e intersticial, prejudicando a função orgânica pelo aumento da distância necessária para a difusão de oxigênio e comprometendo a perfusão

microvascular devido ao aumento da pressão intersticial (93).

Apesar do caráter bastante intuitivo deste paradigma, é forçoso reconhecer que a demonstração direta deste estado de hiperpermeabilidade não é trivial. Em uma excelente revisão, Deutschman e Tracey destacaram que a perda de função da BE é uma evidência comum em pacientes com sepse (94). Achados histopatológicos de autópsia de pacientes sépticos que morreram devido à disfunção orgânica são frequentemente normais, caracterizados principalmente por edema de tecido leve no interstício intracelular e extravascular. Além disso, diversos estudos *in vivo* também demonstraram um aumento na permeabilidade microvascular em modelos de sepse experimental em camundongos, tais como endotoxemia e ligadura e punção cecal (89,92,95,96).

Outra estratégia usada para esta demonstração é o estudo do efeito do plasma, soro ou células destes pacientes sobre modelos *in vitro* de permeabilidade endotelial. Em um estudo que abordou os efeitos da angiopoietina 1 e 2 sobre a integridade de BE na sepse, Parikh e colaboradores demonstraram que o soro de dois pacientes com níveis elevados de angiopoietina-2 era capaz de induzir a formação de lacunas intercelulares em monocamadas de células endoteliais, um efeito que foi revertido pela angiopoietina-1 (97). Além disso, van Eijk e colaboradores demonstraram que o plasma obtido de oito voluntários submetidos a endotoxemia experimental humana foi capaz de induzir um aumento significativo na permeabilidade endotelial após 4 horas de incubação, medido pela migração de FITC-albumina através de monocamadas endoteliais (39). Mais recentemente, um estudo com neutrófilos isolados de dezoito pacientes com sepse usando TNF- α priming de monocamadas de células endoteliais demonstrou que os neutrófilos de pacientes com sepsis induziram mudanças mais profundas no TEER do que os neutrófilos de indivíduos saudáveis (40). E usando a imunofluorescência, Zheng et al relataram que o soro de pacientes com sepsis induziu a formação de lacunas intercelulares em células endoteliais (98).

Com base nestas informações, e reconhecendo a limitação de uma demonstração sistemática do efeito do soro de pacientes com choque séptico em um modelo robusto de BE, nosso primeiro objetivo foi avaliar se o soro de pacientes com choque séptico seria capaz de causar uma quebra da BE.

5.2 A escolha da metodologia ECIS® para análise da quebra da BE

Para testar nossa hipótese, nós primeiramente optamos pelo clássico ensaio de permeabilidade da albumina marcada com FITC. Em resumo, este ensaio tem como princípio avaliar a passagem de macromoléculas através de uma monocamada de células. Para isso, células endoteliais são semeadas em um sistema denominado “Transwell”, que são suportes compostos por dois compartimentos – superior (onde o estímulo é adicionado) e inferior (onde a albumina é coletada) - separados por uma membrana permeável sobre a qual são cultivadas as células endoteliais. A quantificação do grau de integridade da BE é então detectada por fluorimetria através da quantificação dos níveis de albumina marcada com FITC que migraram através da membrana. Porém, apesar de ser um ensaio amplamente utilizado, durante o desenvolvimento do projeto, enfrentamos grandes desafios em sua padronização.

Um dos grandes desafios que enfrentamos com esta técnica foi o elevado coeficiente de variação associado ao método, onde não conseguimos obter uma reprodutibilidade satisfatória, o que nos deixou inseguros na utilização desses dados. Estas dificuldades nos levaram a estabelecer um contato com o grupo do Prof. Dr. Jaime Millan, que lidera um laboratório na Universidade Autônoma de Madri que investiga os mecanismos fisiopatológicos de quebra da BE durante o processo de diapedese de leucócitos, e possui ampla experiência com metodologias de avaliação da quebra de BE (99–101). Este contato nos permitiu concluir que uma estratégia importante para a realização deste projeto seria a associação de uma metodologia para avaliação da integridade da BE que apresentasse menor variabilidade

experimental, e que pudesse nos fornecer informações em tempo real sobre o efeito das amostras de nossos pacientes sobre a integridade da BE. Após avaliação da literatura, pudemos concluir que a metodologia conhecida como “Electric Cell-substrate impedance sensing” (ECIS, Applied Biophysics, NY, EUA) (102) apresentava estas características, sendo amplamente utilizada em estudos sobre a fisiologia da BE. De fato, grande parte dos dados mais robustos sobre a fisiologia da BE foram gerados com o uso desta metodologia, na qual as células endoteliais já são cultivadas sobre eletrodos de ouro, permitindo a mensuração da resistência transendotelial em tempo real. Como não havia ainda no Brasil laboratórios com esta tecnologia, parte dos experimentos foram realizados através de um estágio de 4 meses na Universidad Autonoma de Madrid. Isto permitiu ainda a formação em relação a este método considerado “gold standard” para análise de quebra de BE (103,104), abrindo caminho para estabelecimento desta metodologia em nosso laboratório.

5.3 A associação do soro de pacientes com choque séptico com a quebra da BE

Com um bem estabelecido teste funcional pudemos então explorar o efeito do soro de pacientes com choque séptico sob a barreira endotelial. Nosso grupo de pacientes foi selecionado como uma amostra de conveniência com objetivo de recrutamento de pacientes com alto escore de gravidade da sepse. Isto fica claro através da alta taxa de mortalidade relacionada à sepse (72%) observada. Utilizando amostras de 18 pacientes pudemos demonstrar um aumento significativo na permeabilidade da BE após 4 horas de incubação do soro com as células endoteliais. Além disso, essas alterações funcionais foram associadas a um aumento significativo na extensão das lacunas intercelulares, as quais foram previamente associadas à inflamação e extravasamento plasmático (105). Utilizando abordagens metodológicas semelhantes, a ruptura da BE também foi demonstrada em outras doenças inflamatórias tais como pancreatite, esclerose múltipla e lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão (TRALI) (106–108).

Se pensarmos em quais mecanismos estão envolvidos neste efeito, vários elementos são candidatos a participar da ruptura da BE durante a fase séptica, esse efeito provavelmente resulta da ação combinada de diversos elementos humorais e celulares, como neutrófilos, plaquetas, DAMPs e PAMPs presentes na circulação. Neste contexto, acreditamos que a estratégia de utilizar soro de pacientes e indivíduos saudáveis em nossos experimentos deve ser considerado como o ponto de forte de nosso estudo. Estudos utilizando o método ECIS ou a análise morfológica das junções endoteliais normalmente avaliam o efeito de componentes isolados sobre a BE, como proteínas ou outras moléculas, utilizando meios de cultura ou soro fetal bovino como controle. A aplicação desse método, altamente sensível para perturbações da BE, com uma matriz biológica complexa como o soro resultou em uma grande variabilidade das leituras de TEER tanto em pacientes quanto nos controles saudáveis. Se por um lado isto certamente limitou o poder estatístico de nosso estudo para análise de subgrupos, acreditamos que por outro lado isto valoriza a relevância biológica de nossos achados para o estudo da sepse. Considerando as elevadas expectativas de que a modulação da BE poderia representar um novo alvo terapêutico na sepse (5,88), e o longo histórico de falhas de outras estratégias anteriormente promissoras, acreditamos que esta estratégia nos permitiu obter novos dados sobre a relevância da disfunção da BE no choque séptico humano. Assim, pudemos concluir que o soro de pacientes com choque séptico é capaz de induzir alterações funcionais e morfológicas associadas à ruptura da BE em monocamada de células endoteliais. Estes resultados confirmam e estendem dados de modelos animais na sepse que sugerem que a ruptura da BE é um dos mecanismos patogênicos associados ao choque séptico.

5.4 Mediadores clássicos da quebra da BE no choque séptico

Grande parte da compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que regulam a estabilidade da BE deriva de estudos sobre os mecanismos de angiogênese no embrião, que exige a quebra constante e finamente regulada da

ligação entre células endoteliais.

Os estudos envolvendo a angiogênese tiveram um grande avanço na década de 70, quando Judah Folkman e colaboradores observaram que o crescimento tumoral era fortemente dependente da formação de novos vasos (109) fato o qual impulsionou o entendimento dos mecanismos angiogênicos, iniciando então uma busca pelos fatores que regulariam este processo. Esta busca levou à identificação do VEGF por dois grupos no ano de 1989 (110,111), e na medida em que o interesse por esta proteína focou-se em seu papel sobre células endoteliais pouca atenção foi dada a sua função na quebra da BE. No entanto, é possível encontrar evidências do efeito permeabilizante do VEGF, apresentando potência permeabilizante de até 20000 vezes superior à droga histamina (112). Mas, apesar de seu evidente efeito sobre a integridade da BE, foi apenas a partir de 2005, que a possibilidade da participação do VEGF como mediador do aumento da permeabilidade endotelial foi postulada através de um estudo em pacientes com choque séptico, que apresentavam níveis mais elevados desta proteína do que indivíduos normais (113). Desde então a associação entre níveis circulantes elevados de VEGF-A e a gravidade da sepse em humanos foi demonstrada por vários grupos entre os quais o nosso (33,114,115).

Já as angiopoietinas 1 e 2 participam ativamente processo de angiogênese no embrião, desestabilizando e estabilizando as BE endotelial, respectivamente, permitindo assim a incorporação de novos brotos vasculares (116). Diversos estudos avaliaram a associação entre a Ang-1 e a Ang-2 com a sepse grave e o choque séptico. De uma maneira geral, estes estudos chegavam ao mesmo padrão de resultados caracterizados por aumento dos níveis de moduladores associados a quebra da barreira endotelial como a Ang-2, e redução das concentrações de moduladores associados a estabilização da barreira, como a Ang-1 (34,97,117–119).

As evidências de que o VEGF-A e a Ang-2 desempenham papéis-chave na remodelagem da BE durante a angiogênese embrionária (120) nos levou à

hipótese de que níveis circulantes mais elevados destas duas proteínas observadas em pacientes com choque séptico (34,97,113) poderiam ser os mediadores da permeabilidade microvascular em nossos pacientes. Uma possibilidade que, diga-se de passagem, ainda não foi formalmente demonstrada em humanos.

Em nosso estudo, embora os níveis de Ang-2 estivessem acentuadamente elevados no choque séptico, não foi observada correlação entre esses níveis e o efeito permeabilizante do soro na BE (%TEER). Além disso, embora pudéssemos demonstrar que os níveis de VEGF-A no soro se correlacionaram com a ruptura da BE, conforme medido pelo ECIS, o fato dos níveis de VEGF-A serem semelhantes entre pacientes e controles sugeriram que mediadores adicionais estavam envolvidos nestas mudanças.

5.5 Heme como mediador da ativação endotelial no choque séptico

Há mais de 50 anos é sabido que pacientes com hemólise crônica apresentam níveis mais elevados de heme na circulação (121). Além disso, os últimos 20 anos mostraram que além de seus efeitos tóxicos diretos sobre membranas celulares, o heme é também capaz de ativar diversos compartimentos da imunidade inata, tais como as vias dependentes do TLR-4 e Syk (71,72), a ativação de neutrófilos (69), a necroptose (122), ativação do complemento (73), o inflamassoma NLRP3 (123) e a formação dos NETs (75). Estes dados por si só permitem a hipótese de que o heme seja um mediador relevante na fisiopatologia do choque séptico.

Em modelos de doença, o heme livre já foi associado à patogênese da sepse, e da lesão pulmonar aguda, esta última em modelos animais de doença falciforme (46,78). Em relação à liberação de heme na sepse, já foi demonstrado que esta condição está associada a danos na membrana das hemácias, resultando em hemólise e consequente liberação de hemoglobina livre na circulação (124,125). A oxidação da hemoglobina livre pode ser altamente prejudicial para o hospedeiro, pois pode exacerbar a inflamação (126) e liberar heme (53), cujo dano pode ser

potencializado pela presença de outros mediadores pró-inflamatórios (51), o que contribuiria para a insuficiência orgânica da sepse grave (46). Estudos recentes demonstraram que pacientes com sepse possuem consideráveis níveis circulantes de hemoglobina livre e que estes estão associados com um pior prognóstico e maior mortalidade (82,127). Esse aumento nos níveis de hemoglobina livre pode ser devido a uma hemólise aumentada e/ou a uma redução da degradação da hemoglobina (128). Do ponto de vista de mecanismos que conduzem a hemólise na sepse, vários foram propostos: 1) agentes patogênicos são capazes de induzir hemólise através de toxinas (129) 2) as cadeias de fibrina geradas pela coagulação intravascular disseminada na sepse podem destruir os eritrócitos (130), 3) o sistema complemento, que é ativado durante a sepse, pode prejudicar a viabilidade dos eritrócitos (131), 4) o LPS pode afetar as propriedades mecânicas da membrana, potencializando assim a destruição celular (132), e 5) a sepse induz a morte de eritrócitos pela “eritose”, um mecanismo semelhante à apoptose (125).

Mais recentemente, demonstrou-se que hemoglobina livre induz inflamação, lesão pulmonar e aumenta a permeabilidade alveolar-capilar em um modelo de lesão pulmonar aguda murina. Além disso, também demonstraram que o heme livre aumenta a permeabilidade paracelular em células epiteliais de pulmão (85). Ainda nesta linha, Lin e colaboradores avaliaram os níveis de hemopexina e heme livre em pacientes com sepse e lesão pulmonar aguda e mostraram que dois pacientes apresentaram níveis extremamente baixos de hemopexina ($<250 \mu\text{g} / \text{ml}$) e níveis elevados de heme, onde o paciente com maior nível de heme ($>100\mu\text{M}$) foi a óbito (81).

Finalmente, foi demonstrado que níveis elevados de heme livre correlacionaram-se com uma mortalidade exacerbada em camundongos *knockout* para HO-1 (Hmox1^{-/-}) submetidos a infecção microbiana. Além disso, a administração de heme livre em camundongos selvagens (Hmox1^{+/+}) submetidos a infecção microbiana de baixo grau (não-letal) foi suficiente para provocar uma forma letal de sepse grave, e quando submetidos à tratamento com hemopexina, o

desenvolvimento de sepse grave em camundongos (Hmox1+/+) submetidos a infecção microbiana de alto grau foi suprimido. Com base nestes dados, os autores concluíram que o dano tecidual causado pelo heme livre pode contribuir para a patogênese da sepse grave (46).

Perante essas evidências, nos questionamos se o heme também não poderia ser um mediador da quebra da BE no choque séptico, agindo de forma independente ou em sinergia com outros mediadores como o VEGF e a Ang-2 em nossa população. Cabe destacar que o efeito do heme sobre a integridade da BE já havia sido demonstrado em modelos animais (80,133,134).

Nossos resultados são a primeira demonstração de que os níveis de heme estão aumentados no choque séptico em uma mesma magnitude observada em anemias hemolíticas como a doença falciforme e, ainda mais relevante, que os altos níveis de heme se correlacionam com a gravidade da sepse. Além disso, também demonstramos que a ruptura da BE causada pelo soro de pacientes com choque séptico em monocamadas de células endoteliais se correlacionou com os níveis de heme, sugerindo que o heme poderia ser um mediador da permeabilidade microvascular durante o choque séptico.

Para fornecer evidência direta de que o heme poderia estar diretamente envolvido na ruptura da BE durante o choque séptico, utilizamos o mesmo painel de ensaios morfológicos e funcionais que foram previamente utilizados para caracterizar a quebra de BE na sepse, e também já usados em outras condições relacionadas à quebra da BE como a Síndrome de Vazamento Capilar Sistêmico (135). Neste modelo, o heme induziu um aumento acentuado na permeabilidade endotelial de monocamadas de HUVEC que era evidente já 30 minutos após a estimulação e permaneceu significativo até 2 horas depois disso. Além disso, as análises morfológicas revelaram que o heme era capaz de perturbar a anatomia das junções aderentes. É importante notar que a natureza transitória das alterações induzidas pelo heme na BE, além dos resultados do ensaio MTT, indicam que outros mecanismos além da morte celular subjazem à alteração observada na integridade

da barreira. Este aspecto é relevante pois um estudo recente que também mostrou o efeito do heme sobre a BE em células endoteliais pulmonares identificou a necroptose como mecanismo de alteração da BE (136).

5.6 Mecanismos celulares de quebra da BE induzido pelo heme

Os potenciais mecanismos pelos quais o heme induz a ruptura da BE incluem a internalização da VE-caderina ativada por alterações no estado de fosforilação de proteínas das junções aderentes, e a ativação de RhoGTPases. Em relação ao primeiro, estudos em culturas celulares e em camundongos geneticamente modificados mostraram que a perda das interações da VE-caderina e suas proteínas associadas, mediadas por estímulos pró-inflamatórios tais como VEGF-A, trombina e endotoxina, desempenha um papel crítico na remodelagem das junções aderentes e consequente quebra da BE e aumento da permeabilidade endotelial (86,137,138). Em relação ao segundo mecanismo, o heme poderia modificar a regulação espaço-temporal da função da BE mediada pelas pequenas GTPases Rac1 e RhoA (139). Como já destacado, a necroptose mediada pelo TLR-4 foi recentemente proposta como um mecanismo adicional para a ruptura da BE induzida pelo heme (136).

Uma causa bem descrita para a remodelagem das junções aderentes é a internalização da VE-caderina em vesículas intracelulares, removendo-a assim da superfície celular, resultando em uma ruptura reversível das junções célula-célula até que os níveis de VE-caderina sejam restaurados. Em nosso trabalho, nós observamos, em um dado ainda preliminar, que o heme livre pode participar do processo de internalização da VE-caderina. Através da técnica de biotinylation da superfície celular pudemos avaliar o tráfego da VE-caderina após estímulo com duas doses crescentes de heme (30 e 100 μ M), que nos mostrou um aumento discreto nos níveis de internalização em uma maneira dose-dependente. Por se tratar de um dado muito preliminar (apenas 1 experimento), não podemos afirmar que o heme causa a internalização da VE-caderina, mas este dado abre caminho para que este

mecanismo seja estudado mais profundamente. Interessantemente, a liberação da forma solúvel da VE-caderina mediada por LPS ou TNF- α de foi recentemente proposta como um mecanismo de quebra da BE durante a sepse (140).

Outro mecanismo que compromete a função da BE é a fosforilação da VE-caderina em resíduos tirosina, promovendo a remodelação das junções aderentes. Agentes que aumentam a permeabilidade, tais como VEGF (23), TNF- α (141) ou histamina (142) induzem essa fosforilação *in vitro*. Contudo, existem dados contraditórios sobre qual resíduo específico de tirosina da VE-caderina (Tyr658, Tyr685, Tyr731) se torna fosforilado em células endoteliais (143). Nós avaliamos o resíduo Tyr731, que consiste no sítio de ligação da VE-caderina com a β -catenina. Apesar de uma tendência a um aumento da fosforilação da VE-caderina após estímulo com heme, esse aumento não foi significativo. Um fato interessante desta abordagem é que ainda não há estudos que demonstrem o papel do heme na modelagem das junções aderentes, apesar do crescente interesse da ação desta molécula no endotélio. Assim estes dados também representam um ponto de partida para novos estudos envolvendo essas vias. A definição da importância relativa de cada um desses mecanismos na ruptura da BE induzida pelo heme pode abrir caminho para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o choque séptico.

5.7 Visão integrada do papel do heme na quebra da BE no choque séptico

Embora nossos dados tenham como foco o papel de um único mediador na fisiopatologia da quebra de BE no choque séptico, isto não deve ser interpretado como a defesa de ser o heme o único, ou mesmo o mais importante mediador deste processo. Nosso olhar em um ponto específico da complexa cascata de eventos da sepse tem como objetivo tentar dissecar mais um detalhe da fisiopatologia desta condição, ainda pouco explorado na literatura. Se por um lado as amplas evidências de que o heme atua como um ativador de diversos compartimentos da imunidade inata, somadas a nossos dados apoiem que o heme esteja associado à quebra da BE

na sepse, é importante reconhecer a complexidade dos efeitos do heme na resposta inflamatória, assim como algumas especificidades do estudo do heme.

Como já discutido, o heme é um potente indutor da enzima anti-inflamatória heme-oxigenase-1 (144), assim como outros genes antioxidantes regulados pelo fator de transcrição *Nrf2*. Em diversos modelos inflamatórios crônicos e agudos, a exposição ao heme resulta em redução do dano tecidual e melhora do fenótipo inflamatório, dependente do aumento da expressão de HO-1. Isto já foi demonstrado em modelos animais de trombose (145), aterosclerose (146), sangramento de sistema nervoso central (147), e até mesmo de sepse, onde os efeitos divergentes do heme foram bem demonstrados em um estudo em modelos animais que mostram que o impacto na sepse, deletério ou protetor, depende de pequenas diferenças no momento em que o heme é utilizado (148). Desta forma, é razoável supor que aspectos pouco controláveis em pacientes com choque séptico como a cinética de liberação do heme pela hemólise intravascular, o grau de indução de HO-1 e até mesmo polimorfismos que interferem na função desta enzima (149) possam definir como esta via influência na fisiopatologia do choque séptico.

Outro elemento não controlado em nosso estudo, que também pode influenciar de forma heterogênea no impacto desta via em pacientes com choque séptico são os níveis de hemopexina ou de outras proteínas que se ligam ao heme. É razoável supor que a relação heme:hemopexina seja mais relevante que os níveis isolados de heme na fisiopatologia da quebra da BE. Como a albumina é uma destas proteínas, fica fácil contemplar como estes fatores são variáveis no contexto do choque séptico.

Além destas interações, é importante também reconhecer algumas especificidades dos estudos com heme que devem ser considerados na interpretação de quaisquer estudos com heme. Em primeiro lugar, é amplamente reconhecido que a contaminação do heme com endotoxina pode influenciar nos resultados, já que o heme atua por vias semelhantes ao LPS. Em nosso laboratório, diferentes preparações de heme (3 fontes distintas, com mais de um lote por fonte)

vêm sendo utilizadas com resultados consistentes em diferentes modelos de inflamação (hemostasia e ativação endotelial), o que torna pouco provável esta possibilidade. Além disso, a preparação utilizada nos experimentos aqui demonstrados é aquela já testada por outros pesquisadores da área, e apontada em comunicação verbal como menos sujeita a contaminação. Outro cuidado utilizado em nosso laboratório é o preparo do heme e do veículo sob as mesmas condições, utilizando os mesmos insumos (vidrarias, água, e até mesmo sistema de diluição).

Um aspecto mais desafiador é talvez a questão da dosagem de heme em matrizes biológicas, usada em nosso estudo. Há uma grande discussão na literatura se o heme total seria mais ou menos relevante que o heme livre, cuja dosagem exige a subtração do heme ligado a proteínas pelo uso de filtros (150). A complexidade desta questão foi recentemente amplificada por um estudo que sugere que os métodos usados para dosagem do heme não seriam capazes de medir o heme livre, e que também avaliam a hemoglobina livre (151). Embora esta limitação não interfira na parte mais relevante de nossos resultados, que mostra a quebra da BE em pacientes com choque séptico e induzida pelo heme, é forçoso admitir que ela pode influenciar sim na associação entre estas duas observações. Como o método usado por nós para dosagem do heme é aquele mais utilizado na literatura, resta-nos reconhecer esta possibilidade durante a interpretação dos resultados.

Em conclusão, organismos vivos desenvolveram sistemas complexos intra e extracelulares para lidar com a presença e heme extracelular livre que podem ao mesmo tempo amplificar lesão ou proteger o organismo. O papel positivo (protetor) destes mecanismos foi certamente selecionado por pressões evolutivas desconhecidas que podem não incluir condições tão extremas como o choque séptico. Isto torna razoável imaginar que níveis elevados de heme vençam todos estes sistemas de controle, e resulte em dano tecidual.

6. CONCLUSÃO

Nossos dados permitem concluir que:

1. O soro de pacientes com choque séptico é capaz de induzir a quebra da barreira endotelial em monocamadas de HUVECs *in vitro*
2. Os níveis séricos de mediadores clássicos da integridade da BE, Ang-2 e VEGF-A não apresentam correlação com a magnitude da quebra da BE induzida pelo soro de pacientes com choque séptico nestas monocamadas
3. Níveis séricos elevados de heme são observados no choque séptico, e se correlacionam com a gravidade da sepse
4. O heme, nas concentrações comumente observadas em pacientes com anemias hemolíticas, é capaz de induzir alterações funcionais e morfológicas na BE condizentes com o aumento da permeabilidade.
5. Em conjunto, estes dados mostram a associação entre o heme livre e a quebra da BE no choque séptico humano, sugerindo uma relação causal entre heme e quebra da BE nestes pacientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Angus DC (Pitt), van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840–51.
2. Bone RC. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA*. 1992;268(24):3452–5.
3. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Opal SM, Sevransky JE, et al. Surviving Sepsis Campaign. *Int Guidel Manag Sev Sepsis Septic Shock*. 2013;41(2):580–637.
4. Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012 Sep;303(5):L355–63.
5. Cohen J, Vincent J-L, Adhikari NKJ, Machado FR, Angus DC, Calandra T, et al. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis*. 2015 May;15(5):581–614.
6. Andriolo BN, Andriolo RB, Salomão R, Atallah Álvaro N. Effectiveness and safety of procalcitonin evaluation for reducing mortality in adults with sepsis, severe sepsis or septic shock. In: Andriolo RB, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2017.
7. Opal SM, Laterre P-F, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira J-P, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA*. 2013 Mar;309(11):1154–62.
8. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut J-F, Douglas IS, Finfer S, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med*. 2012 May;366(22):2055–64.
9. Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2001 Oct;286(15):1869–78.
10. van der Poll T, Opal SM, Rosenson R, Smith T, Hackam D, Ayala A. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis*. Elsevier; 2008 Jan;8(1):32–43.
11. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Mar;4(3).
12. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. NIH Public Access; 2010 Dec;10(12):826–37.
13. Salomao R, Brunialti MKC, Rapozo MM, Baggio-Zappia GL, Galanos C, Freudenberg M. Bacterial Sensing, Cell Signaling, and Modulation of the Immune Response During Sepsis. *Shock*. 2012 Aug;38(3):227–42.
14. Lakshmikanth CL, Jacob SP, Chaithra VH, de Castro-Faria-Neto HC, Marathe GK. Sepsis: in search of cure. *Inflamm Res*. Springer International Publishing; 2016;1–16.
15. Fiusa MML, Carvalho-Filho MA, Annichino-Bizzacchi JM, De Paula E V. Causes

- and consequences of coagulation activation in sepsis: an evolutionary medicine perspective. *BMC Med.* 2015 Jan;13:105.
16. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003 May;101(10):3765–77.
 17. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar;303(5663):1532–5.
 18. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011 Sep;146(6):873–87.
 19. Bravi L, Dejana E, Lampugnani MG. VE-cadherin at a glance. *Cell Tissue Res.* 2014 Mar;355(3):515–22.
 20. Trani M, Dejana E. New insights in the control of vascular permeability: vascular endothelial-cadherin and other players. *Curr Opin Hematol.* 2015 May;22(3):267–72.
 21. Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejana E, Huber P. Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun;94(12):6273–8.
 22. Radeva MY, Waschke J. Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta Physiol (Oxf).* 2017 Feb;
 23. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci.* 1998;111(13).
 24. Garrett JP, Lowery AM, Adam A, Kowalczyk AP, Vincent PA. Regulation of endothelial barrier function by p120-catenin·VE-Cadherin interaction. *Mol Biol Cell.* 2016 Nov;
 25. Grinnell KL, Casserly B, Harrington EO. Role of protein tyrosine phosphatase SHP2 in barrier function of pulmonary endothelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010 Mar;298(3):L361-70.
 26. Vega FM, Ridley AJ. SnapShot: Rho Family GTPases. *Cell.* 2007;129(7).
 27. van Nieuw Amerongen GP, Beckers CML, Achekar ID, Zeeman S, Musters RJP, van Hinsbergh VWM. Involvement of Rho kinase in endothelial barrier maintenance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Nov;27(11):2332–9.
 28. van Buul JD, Timmerman I. Small Rho GTPase-mediated actin dynamics at endothelial adherens junctions. *Small GTPases.* 2016 Jan;7(1):21–31.
 29. Ortega MC, Santander-García D, Marcos-Ramiro B, Barroso S, Cox S, Jiménez-Alfaro I, et al. Activation of Rac1 and RhoA Preserve Corneal Endothelial Barrier Function. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016 Nov;57(14):6210–22.
 30. Nusrat A, Giry M, Turner JR, Colgan SP, Parkos CA, Carnes D, et al. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Nov;92(23):10629–33.
 31. Hakanpää L, Sipilä T, Leppanen V-M, Gautam P, Nurmi H, Jacquemet G, et al.

- Endothelial destabilization by angiopoietin-2 via integrin $\beta 1$ activation. *Nat Commun.* 2015 Jan;6:5962.
32. Alves BE, Montalvao SA, Aranha FJ, Siegl TF, Souza CA, Lorand-Metze I, et al. Imbalances in serum angiopoietin concentrations are early predictors of septic shock development in patients with post chemotherapy febrile neutropenia. *BMC Infect Dis.* 2010;10.
 33. Alves BE, Montalvao SAL, Aranha FJP, Lorand-Metze I, De Souza CA, Annichino-Bizzacchi JM, et al. Time-course of sFlt-1 and VEGF-A release in neutropenic patients with sepsis and septic shock: a prospective study. *J Transl Med.* 2011;9(1):1–8.
 34. Fiusa MML, Costa-Lima C, de Souza GR, Vigorito AC, Aranha FJP, Lorand-Metze I, et al. A high angiopoietin-2/angiopoietin-1 ratio is associated with a high risk of septic shock in patients with febrile neutropenia. *Crit Care.* 2013 Aug 5;17(4):R169.
 35. Shao M, Tang S-T, Liu B, Zhu H-Q. Rac1 mediates HMGB1-induced hyperpermeability in pulmonary microvascular endothelial cells via MAPK signal transduction. *Mol Med Rep.* Greece; 2016 Jan;13(1):529–35.
 36. Wolfson RK, Chiang ET, Garcia JGN. HMGB1 induces human lung endothelial cell cytoskeletal rearrangement and barrier disruption. *Microvasc Res.* NIH Public Access; 2011 Mar;81(2):189–97.
 37. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker H V, Xu W, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Feb;110(9):3507–12.
 38. Orsenigo F, Giampietro C, Ferrari A, Corada M, Galaup A, Sigismund S, et al. Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nat Commun.* 2012;3:1208.
 39. van Eijk LT, Nootboom A, Hendriks T, Sprong T, Netea MG, Smits P, et al. PLASMA OBTAINED DURING HUMAN ENDOTOXEMIA INCREASES ENDOTHELIAL ALBUMIN PERMEABILITY IN VITRO. *Shock.* 2006 Apr;25(4):358–62.
 40. Fox ED, Heffernan DS, Cioffi WG, Reichner JS. Neutrophils from critically ill septic patients mediate profound loss of endothelial barrier integrity. *Crit Care. Critical Care;* 2013 Oct 7;17(5):R226.
 41. Larsen R, Gouveia Z, Soares MP, Gozzelino R. Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. *Front Pharmacol.* 2012;3 MAY(May):1–17.
 42. Dutra FF, Bozza MT. Heme on innate immunity and inflammation. *Frontiers in Pharmacology.* Frontiers; 2014. p. 115.
 43. Soares MP, Bozza MT. Red alert: labile heme is an alarmin. *Curr Opin Immunol.* 2016 Feb;38:94–100.
 44. Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett.* 2005;157(3):175–88.

45. Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited: Exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*. American Society of Hematology; 2013. p. 1276–84.
46. Larsen R, Gozzelino R, Jeney V, Tokaji L, Bozza FA, Japiassu AM, et al. A Central Role for Free Heme in the Pathogenesis of Severe Sepsis. *Sci Transl Med*. American Association for the Advancement of Science; 2010 Sep 29;2(51):51ra71-51ra71.
47. ZAGO MA, FALCÃO RP, PASQUINI R. *Tratado de Hematologia*. 1st ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2013. 1064 p.
48. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Academy of Sciences; 1968 Oct;61(2):748–55.
49. Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem*. 1986 Jan 5;261(1):411–9.
50. Trakshel GM, Kutty RK, Maine MD. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Purification and Characterization of the Major Constitutive Form of Testicular Heme Oxygenase. *J Biol Chem*. 1986;261(24):11131–7.
51. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. Annual Reviews ; 2010 Feb;50(1):323–54.
52. Hebbel RP, Morgan WT, Eaton JW, Hedlund BE. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Academy of Sciences; 1988 Jan;85(1):237–41.
53. Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphany S, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med*. Nature Publishing Group; 2007 Jun 13;13(6):703–10.
54. Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Soares MP. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J Mol Med*. Springer-Verlag; 2008 Oct 19;86(10):1097–111.
55. Levy AP, Asleh R, Blum S, Levy NS, Miller-Lotan R, Kalet-Litman S, et al. Haptoglobin: Basic and Clinical Aspects. *Antioxid Redox Signal*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA ; 2010 Jan 15;12(2):293–304.
56. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman H-J, Law SKA, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. 2001 Jan 11;409(6817):198–201.
57. Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, et al. Hemoglobin Scavenger Receptor CD163 Mediates Interleukin-10 Release and Heme Oxygenase-1 Synthesis. *Circ Res*. 2004;94(1).
58. Quaye IK. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.

- 2008 Aug;102(8):735–42.
59. Deuel JW, Vallelian F, Schaer CA, Puglia M, Buehler PW, Schaer DJ. Different target specificities of haptoglobin and hemopexin define a sequential protection system against vascular hemoglobin toxicity. *Free Radic Biol Med*. 2015;89:931–43.
 60. Roumenina LT, Rayes J, Lacroix-Desmazes S, Dimitrov JD. Heme: Modulator of Plasma Systems in Hemolytic Diseases. *Trends Mol Med*. 2016;22(3):200–13.
 61. Baker EN, Paoli M, Anderson BF, Baker HM, Morgan WT, Smith A. Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two beta-propeller domains. *Nat Struct Biol*. 1999 Oct 1;6(10):926–31.
 62. Tolosano E, Fagoonee S, Morello N, Vinchi F, Fiorito V. Heme Scavenging and the Other Facets of Hemopexin. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Jan 15;12(2):305–20.
 63. Hvidberg V, Maniecki MB, Jacobsen C, Højrup P, Møller HJ, Moestrup SK. Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2572–9.
 64. Larsson J, Allhorn M, Åkerström B. The lipocalin α 1-microglobulin binds heme in different species. *Arch Biochem Biophys*. 2004;432(2):196–204.
 65. Cederlund M, Deronic A, Pallon J, Sørensen OE, Åkerström B. A1M/ α 1-microglobulin is proteolytically activated by myeloperoxidase, binds its heme group and inhibits low density lipoprotein oxidation. *Front Physiol*. Frontiers Media SA; 2015;6:11.
 66. Miller YI, Shaklai N. Kinetics of hemin distribution in plasma reveals its role in lipoprotein oxidation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 1999;1454(2):153–64.
 67. Sacerdoti D, Abraham NG, Maines MD, Jeney V, Immenschuh S, Vijayan V, et al. Heme as a Target for Therapeutic Interventions. *Front Pharmacol*. 2017;8.
 68. Wagener FADTG, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJG, Verhofstad A, Abraham NG, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*. 2001 Sep;98(6):1802–11.
 69. Graça-Souza A V., Arruda MAB, De Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: Implications for inflammatory processes. *Blood*. 2002;99(11):4160–5.
 70. Arruda MA, Graça-Souza A V., Barja-Fidalgo C. Heme and innate immunity: New insights for an old molecule. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(7):799–803.
 71. Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, et al. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2007 Jul;282(28):20221–9.
 72. Fernandez PL, Dutra FF, Alves L, Figueiredo RT, Mourão-Sa D, Fortes GB, et al. Heme amplifies the innate immune response to microbial molecules through spleen tyrosine kinase (Syk)-dependent reactive oxygen species generation. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2010 Oct

- 22;285(43):32844–51.
73. Frimat M, Tabarin F, Dimitrov JD, Poitou C, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, et al. Complement activation by heme as a secondary hit for atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2013;122(2).
 74. Dutra FF, Alves LS, Rodrigues D, Fernandez PL, de Oliveira RB, Golenbock DT, et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Academy of Sciences; 2014 Sep 30;111(39):E4110-8.
 75. Chen G, Zhang D, Fuchs TA, Manwani D, Wagner DD, Frenette PS. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood*. 2014 Jun 12;123(24):3818–27.
 76. Vasconcellos LRC, Dutra FF, Siqueira MS, Paula-Neto HA, Dahan J, Kiarely E, et al. Protein aggregation as a cellular response to oxidative stress induced by heme and iron. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;201608928.
 77. de Souza GR, Hounkpe BW, Fiusa MML, Colella MP, Annichino-Bizzacchi JM, Traina F, et al. Tissue factor-dependent coagulation activation by heme: A thromboelastometry study. Connes P, editor. *PLoS One*. 2017 Apr;12(4):e0176505.
 78. Ghosh S, Adisa OA, Chappa P, Tan F, Jackson KA, Archer DR, et al. Extracellular hemin crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice. *J Clin Invest*. 2013 Nov;123(11):4809–20.
 79. Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI, et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood*. 2014 Jan;123(3):377–90.
 80. Sparkenbaugh EM, Chantrathammachart P, Wang S, Jonas W, Kirchhofer D, Gailani D, et al. Excess of heme induces tissue factor-dependent activation of coagulation in mice. *Haematologica*. 2015;100(3):308–13.
 81. Lin T, Maita D, Thundivalappil SR, Riley FE, Hambsch J, Van Marter LJ, et al. Hemopexin in severe inflammation and infection: mouse models and human diseases. *Crit Care*. BioMed Central; 2015 Dec 6;19(1):166.
 82. Janz DR, Bastarache JA, Sills G, Wickersham N, May AK, Bernard GR, et al. Association between haptoglobin, hemopexin and mortality in adults with sepsis. *Crit Care*. 2013;17(6):R272.
 83. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*. 2013 Feb;41(2):580–637.
 84. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. 1996;22.
 85. Shaver CM, Upchurch CP, Janz DR, Grove BS, Putz ND, Wickersham NE, et al. Cell-free hemoglobin: a novel mediator of acute lung injury. *Am J Physiol - Lung*

- Cell Mol Physiol. 2016 Mar 15;310(6):L532–41.
86. Gavard J. Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adh Migr*. 2014 Jan;8(2):158–64.
 87. Opal SM, van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J Intern Med*. 2015;277(3):277–93.
 88. Goldenberg NM, Steinberg BE, Slutsky AS, Lee WL. Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis. *Sci Transl Med*. 2011;3(88):88ps25.
 89. Maas M, Stapleton M, Bergom C, Mattson DL, Newman DK, Newman PJ. Endothelial cell PECAM-1 confers protection against endotoxic shock. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Jan;288(1):H159-64.
 90. Kumpers P, Gueler F, David S, Slyke P Van, Dumont DJ, Park J-K, et al. The synthetic tie2 agonist peptide vasculotide protects against vascular leakage and reduces mortality in murine abdominal sepsis. *Crit Care*. 2011;15(5):R261.
 91. London NR, Zhu W, Bozza FA, Smith MCP, Greif DM, Sorensen LK, et al. Targeting Robo4-dependent Slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. *Sci Transl Med*. 2010 Mar 17;2(23):23ra19.
 92. Hickey MJ, Issekutz AC, Reinhardt PH, Fedorak RN, Kubes P. Endogenous interleukin-10 regulates hemodynamic parameters, leukocyte-endothelial cell interactions, and microvascular permeability during endotoxemia. *Circ Res*. 1998 Nov;83(11):1124–31.
 93. Lee WL, Slutsky AS. Sepsis and Endothelial Permeability. *N Engl J Med*. Massachusetts Medical Society; 2010 Aug 12;363(7):689–91.
 94. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: Current Dogma and New Perspectives. *Immunity*. 2014 Apr 17;40(4):463–75.
 95. Li Y, Hadden C, Cooper A, Ahmed A, Wu H, Lupashin V V, et al. Sepsis-induced elevation in plasma serotonin facilitates endothelial hyperpermeability. *Sci Rep*. England; 2016 Mar 9;6:22747.
 96. Lee W, Ku S-K, Bae J-S. Factor Xa inhibits HMGB1-induced septic responses in human umbilical vein endothelial cells and in mice. *Thromb Haemost*. Germany; 2014 Oct;112(4):757–69.
 97. Parikh SM, Mammoto T, Schultz A, Yuan H-T, Christiani D, Karumanchi SA, et al. Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *PLoS Med*. 2006 Mar;3(3):e46.
 98. Zheng Y-J, Xu W-P, Ding G, Gao Y-H, Wang H-R, Pan S-M. Expression of HMGB1 in septic serum induces vascular endothelial hyperpermeability. *Mol Med Rep*. Greece; 2016 Jan;13(1):513–21.
 99. Aranda JF, Reglero-Real N, Marcos-Ramiro B, Ruiz-Sáenz A, Fernández-Martín L, Bernabé-Rubio M, et al. MYADM controls endothelial barrier function through ERM-dependent regulation of ICAM-1 expression. *Mol Biol Cell*. 2013 Feb;24(4):483–94.
 100. Fernández-Martín L, Marcos-Ramiro B, Bigarella CL, Graupera M, Cain RJ, Reglero-Real N, et al. Crosstalk between reticular adherens junctions and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 regulates endothelial barrier

- function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Aug;32(8):e90-102.
101. Marcos-Ramiro B, García-Weber D, Barroso S, Feito J, Ortega MC, Cernuda-Morollón E, et al. RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border. *J Cell Biol.* 2016 May;213(3):385–402.
 102. Tiruppathi C, Malik AB, Del Vecchio PJ, Keese CR, Giaever I. Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(17):7919–23.
 103. Bischoff I, Hornburger MC, Mayer BA, Beyerle A, Wegener J, Fürst R. Pitfalls in assessing microvascular endothelial barrier function: impedance-based devices versus the classic macromolecular tracer assay. *Sci Rep.* 2016;6:23671.
 104. Szulcek R, Bogaard HJ, van Nieuw Amerongen GP. Electric cell-substrate impedance sensing for the quantification of endothelial proliferation, barrier function, and motility. *J Vis Exp.* 2014 Jan;(85).
 105. McDonald DM, Thurston G, Baluk P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. *Microcirculation.* 1999 Mar;6(1):7–22.
 106. Marcos-Ramiro B, Oliva Nacarino P, Serrano-Pertierra E, Blanco-Gelaz M, Weksler BB, Romero IA, et al. Microparticles in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: effect on endothelial barrier function. *BMC Neurosci.* 2014;15(1):110.
 107. Zheng Y, Zhou B, Ding G, Wang Z. Effect of Serum From Patients With Severe Acute Pancreatitis on Vascular Endothelial Permeability. *Pancreas.* 2013;42(4):633–9.
 108. Wakamoto S, Fujihara M, Sakagawa H, Takahashi D, Niwa K, Morioka M, et al. Endothelial permeability is increased by the supernatant of peripheral blood mononuclear cells stimulated with HLA Class II antibody. *Transfusion.* 2008 Oct;48(10):2060–8.
 109. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med.* 1971 Feb 1;133(2):275–88.
 110. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science.* 1989 Dec 8;246(4935):1309–12.
 111. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel D V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989 Dec 8;246(4935):1306–9.
 112. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology;* 1995 May;146(5):1029–39.
 113. van der Flier M, van Leeuwen HJ, van Kessel KP, Kimpen JL, Hoepelman AI, Geelen SP. Plasma vascular endothelial growth factor in severe sepsis. *Shock.* 2005 Jan;23(1):35–8.
 114. Page A V, Liles WC. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in

- infectious diseases. *Virulence*. 2013 Aug;4(6):507–16.
115. Pickkers P, Sprong T, Eijk L van, Hoeven H van der, Smits P, Deuren M van. Vascular endothelial growth factor is increased during the first 48 hours of human septic shock and correlates with vascular permeability. *Shock*. 2005 Dec;24(6):508–12.
 116. Conway E, M.A. G, K.R. A, M.A. G, J.N. T, E. K. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. Oxford University Press; 2001 Feb 16;49(3):507–21.
 117. Siner JM, Bhandari V, Engle KM, Elias JA, Siegel MD. ELEVATED SERUM ANGIOPOIETIN 2 LEVELS ARE ASSOCIATED WITH INCREASED MORTALITY IN SEPSIS. *Shock*. 2009 Apr;31(4):348–53.
 118. Carrol ED. Angiopoietins as prognostic biomarkers and effector molecules in severe sepsis. *Crit Care Med*. Europe PMC Funders; 2011 Sep;39(9):2203–4; author reply 2204.
 119. Ricciuto DR, dos Santos CC, Hawkes M, Toltl LJ, Conroy AL, Rajwans N, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 as clinically informative prognostic biomarkers of morbidity and mortality in severe sepsis*. *Crit Care Med*. 2011 Apr;39(4):702–10.
 120. Goddard LM, Iruela-Arispe ML. Cellular and molecular regulation of vascular permeability. *Thromb Haemost*. NIH Public Access; 2013 Mar;109(3):407–15.
 121. Muller-Eberhard U, Javid J, Liem HH, Hanstein A, Hanna M. Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. *Blood*. 1968 Nov;32(5):811–5.
 122. Fortes GB, Alves LS, de Oliveira R, Dutra FF, Rodrigues D, Fernandez PL, et al. Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. *Blood*. 2012 Mar;119(10):2368–75.
 123. Dutra FF, Alves LS, Rodrigues D, Fernandez PL, de Oliveira RB, Golenbock DT, et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc Natl Acad Sci*. 2014 Sep 30;111(39):E4110–8.
 124. BASKURT OK, GELMONT D, MEISELMAN HJ. Red Blood Cell Deformability in Sepsis. 1998;157(2):421–7.
 125. Kempe DS, Akel A, Lang PA, Hermle T, Biswas R, Muresanu J, et al. Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med*. 2007 Mar 9;85(3):273–81.
 126. Silva G, Jeney V, Chora A, Larsen R, Balla J, Soares MP. Oxidized hemoglobin is an endogenous proinflammatory agonist that targets vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2009 Oct 23;284(43):29582–95.
 127. Adamzik M, Hamburger T, Petrat F, Peters J, de Groot H, Hartmann M. Free hemoglobin concentration in severe sepsis: methods of measurement and prediction of outcome. *Crit Care*. BioMed Central; 2012 Jul 16;16(4):R125.
 128. Schaer DJ, Alayash AI. Clearance and Control Mechanisms of Hemoglobin from Cradle to Grave. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Jan 15;12(2):181–4.
 129. Gonzalez MR, Bischofberger M, Pernot L, van der Goot FG, Fr?che B. Bacterial

- pore-forming toxins: The (w)hole story? *Cell Mol Life Sci.* SP Birkhäuser Verlag Basel; 2008 Feb 9;65(3):493–507.
130. Heyes H, Köhle W, Slijepcevic B. The appearance of schistocytes in the peripheral blood in correlation to the degree of disseminated intravascular coagulation. An experimental study in rats. *Haemostasis.* 1976;5(2):66–73.
 131. Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med.* The Feinstein Institute for Medical Research; 2011;17(3–4):317–29.
 132. Brauckmann S, Effenberger-Neidnicht K, de Groot H, Nagel M, Mayer C, Peters J, et al. Lipopolysaccharide-induced hemolysis: Evidence for direct membrane interactions. *Sci Rep.* Nature Publishing Group; 2016 Oct 19;6:35508.
 133. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood.* 2001 Sep 15;98(6):1802–11.
 134. Vinchi F, Gastaldi S, Silengo L, Altruda F, Tolosano E. Hemopexin prevents endothelial damage and liver congestion in a mouse model of heme overload. *Am J Pathol.* American Society for Investigative Pathology; 2008 Jul;173(1):289–99.
 135. Xie Z, Ghosh CC, Patel R, Iwaki S, Gaskins D, Nelson C, et al. Vascular endothelial hyperpermeability induces the clinical symptoms of Clarkson disease (the systemic capillary leak syndrome). *Blood.* 2012;119(18):4321–32.
 136. Singla S, Sysol JR, Dille B, Jones N, Chen J, Machado RF. Hemin Causes Lung Microvascular Endothelial Barrier Dysfunction by Necroptotic Cell Death. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017 Apr 19;rcmb.2016-0287OC.
 137. Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell.* 2013 Sep 16;26(5):441–54.
 138. Adam AP. Regulation of Endothelial Adherens Junctions by Tyrosine Phosphorylation. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:1–24.
 139. Spindler V, Schlegel N, Waschke J. Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovasc Res.* 2010 Jul 15;87(2):243–53.
 140. Flemming S, Burkard N, Renschler M, Vielmuth F, Meir M, Schick MA, et al. Soluble VE-cadherin is involved in endothelial barrier breakdown in systemic inflammation and sepsis. *Cardiovasc Res.* 2015 Jul 1;107(1):32–44.
 141. Angelini DJ, Hyun S-W, Grigoryev DN, Garg P, Gong P, Singh IS, et al. TNF- increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *AJP Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Jul 14;291(6):L1232–45.
 142. Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Oct;19(10):2286–97.
 143. Adam AP. Regulation of Endothelial Adherens Junctions by Tyrosine

- Phosphorylation. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:272858.
144. Belcher JD, Beckman JD, Balla G, Balla J, Vercellotti G. Heme degradation and vascular injury. *Antioxid Redox Signal.* Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA; 2010 Feb;12(2):233–48.
 145. Desbuides N, Rochefort GY, Schlecht D, Machet M-C, Halimi J-M, Eder V, et al. Heme oxygenase-1 inducer hemin prevents vascular thrombosis. *Thromb Haemost.* 2007 Sep;98(3):614–20.
 146. Wang H, Luo W, Wang J, Guo C, Wolffe SL, Wang J, et al. Paradoxical protection from atherosclerosis and thrombosis in a mouse model of sickle cell disease. *Br J Haematol.* NIH Public Access; 2013 Jul;162(1):120–9.
 147. Lu X, Chen-Roetling J, Regan RF. Systemic hemin therapy attenuates blood-brain barrier disruption after intracerebral hemorrhage. *Neurobiol Dis.* NIH Public Access; 2014 Oct;70:245–51.
 148. Freitas A, Alves-Filho JC, Trevelin SC, Spiller F, Suavinha MM, Nascimento DC, et al. Divergent role of heme oxygenase inhibition in the pathogenesis of sepsis. *Shock.* 2011 Jun;35(6):550–9.
 149. Bean CJ, Boulet SL, Ellingsen D, Pyle ME, Barron-Casella EA, Casella JF, et al. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with reduced incidence of acute chest syndrome among children with sickle cell disease. *Blood.* American Society of Hematology; 2012 Nov 1;120(18):3822–8.
 150. Adisa OA, Hu Y, Ghosh S, Aryee D, Osunkwo I, Ofori-Acquah SF. Association between plasma free haem and incidence of vaso-occlusive episodes and acute chest syndrome in children with sickle cell disease. *Br J Haematol.* NIH Public Access; 2013 Sep;162(5):702–5.
 151. Oh J-Y, Hamm J, Xu X, Genschmer K, Zhong M, Lebensburger J, et al. Absorbance and redox based approaches for measuring free heme and free hemoglobin in biological matrices. *Redox Biol.* Elsevier; 2016 Oct;9:167–77.
 152. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* Nature Publishing Group; 2002 Dec 19;420(6917):885–91.
 153. Conde KAP, Silva E, Silva CO, Ferreira E, Freitas FGR, Castro I, et al. Differences in Sepsis Treatment and Outcomes between Public and Private Hospitals in Brazil: A Multicenter Observational Study. Salluh JIF, editor. *PLoS One.* 2013 Jun 6;8(6):e64790.
 154. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med.* 2013;41(5):1167–74.
 155. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascón GA, et al. The Endothelium in Sepsis. *Shock.* 2016;45(3):259–70.
 156. Millán J, Cain RJ, Reglero-Real N, Bigarella C, Marcos-Ramiro B, Fernández-Martín L, et al. Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells. *BMC Biol.* 2010;8(1):1–13.
 157. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983

- Dec;65(1–2):55–63.
158. Dejana E, Vestweber D. The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2013 Jan;116:119–44.
 159. Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V, Mercurio S, Tolosano E. Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front Pharmacol*. 2014 Apr 8;5:61.

8. APÊNDICES

Apêndice 1 - Apresentação do trabalho em forma de pôster no Congresso Internacional de Hemostasia e Trombose (ISTH), a ser realizado em Berlin em Julho de 2017.

Title: Free Heme Triggers the Disruption of the Endothelial Barrier

Topic: Endothelial Cell Signaling

This is a late
breaker abstract: No

Author(s): M.M.L. Fiuza¹, D. Garcia-Weber², M. Lazarini¹, J.M. Annichino-Bizzacchi¹, F. Ferreira Costa¹, J. Millán², E.V. de Paula^{1,3}

Institute(s): ¹University of Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, Brazil, ²Universidad Autónoma de Madrid, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain, ³University of Campinas, Hematology and Hemotherapy Center, Campinas, Brazil

Travel Grant: I want to apply for Reach the World
2614-cv-1485889601.pdf

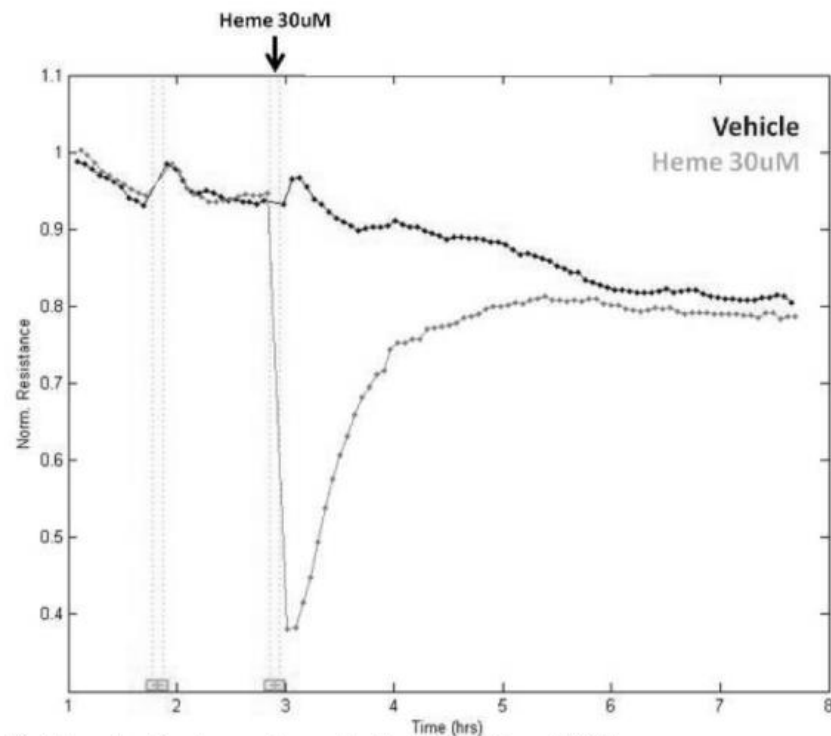
Disclosure: I have no potential conflict of interest.

Text: **Background:** Disruption of the endothelial barrier (EB) is observed during the inflammatory response to invading pathogens, and is thought to facilitate the access of leukocytes and phagocytes to infected or damaged tissues. Heme is an evolutionary conserved molecule present in organisms of all kingdoms, whose role as an activator of innate immunity has been recently demonstrated. Several conditions in which free heme escapes its natural scavenging systems such as sepsis and sickle cell disease are associated with increased microvascular permeability.

Aims: Here we investigated whether free heme could cause changes on EB function and morphology.

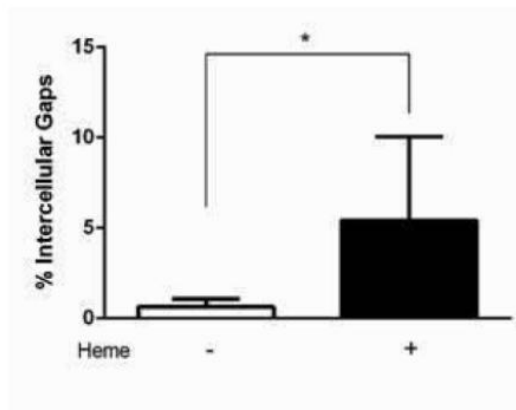
Methods: HUVEC were exposed to heme (30uM) or vehicle, and evaluated using an electric cell-substrate impedance sensing system (ECIS) that measures real-time changes in transendothelial electrical resistance (TEER), and by immunofluorescence (IF) of cell-cell junctions. The % of TEER decrease (which indicates the increase EB permeability) was monitored for at least 4 h. For IF, cells were incubated with heme for 30 minutes, and stained for VE-cadherin.

Results: Heme caused a significant increase in EB permeability that was evident as early as 30 minutes after stimulation (vehicle vs heme: at 30 minutes, 9.76 ± 8.54 vs. 53.60 ± 16.19 , $P = 0.014$; at 1 hour, 8.77 ± 6.82 vs. 38.59 ± 6.84 ; $P = 0.006$), lasted 2 hours (at 2 hours, 9.47 ± 10.10 vs. 33.07 ± 3.59 , $P = 0.019$), and was no longer significant after 4 hours (13.51 ± 13.98 vs. 32.93 ± 9.34 , $P = 0.116$) and at later timepoints (Fig 1).



[Fig 1. Heme stimulation decreases transendothelial electrical resistance (TEER).]

Consistent with these functional changes, the % of intercellular gaps in heme-treated cells was significantly higher (5.41 ± 4.639) when compared to vehicle-treated cells (0.64 ± 0.43 ; $P = 0.05$) (Fig 2).



[Fig 2. Heme induces disruption of adherens junction architecture leading an increase of InterCellular gaps (* $P=0.05$).]

Of note, higher levels of heme were observed in a cohort of patients with septic shock.

Conclusions: Heme induces a reversible increase of EB permeability which is associated with the disruption of the architecture of adherens junctions. Further studies are warranted to investigate the *in vivo* relevance of these findings.

Preferred Presentation Method: Oral or Poster

Title: *In vitro* Disruption of Endothelial Barrier Integrity by Serum from Patients with Septic Shock

Topic: Inflammation and Sepsis

This is a late breaker abstract: No

Author(s): M.M.L. Fiusa¹, L.N.G. Costa¹, G.R. de Souza¹, R.N. Angerami¹, M.A. Carvalho-Filho¹, D. Garcia-Weber², J. Millán², E.V. de Paula^{1,3}

Institute(s): ¹University of Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, Brazil, ²Universidad Autónoma de Madrid, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain, ³University of Campinas, Hematology and Hemotherapy Center, Campinas, Brazil

Travel Grant: I want to apply for Reach the World
2810-cv-1485908870.pdf

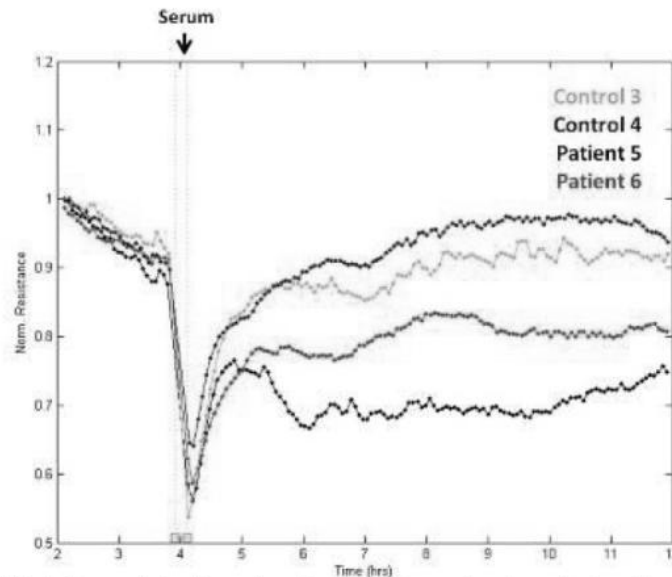
Disclosure: I have no potential conflict of interest.

Text: **Background:** Endothelial barrier (EB) breakdown is a hallmark of sepsis, and pathways that participate in the regulation of EB integrity are emerging as promising targets in septic shock. However, little data is available about EB breakdown in human sepsis.

Aims: Here we investigated the effect of serum from patients with septic shock on EB function.

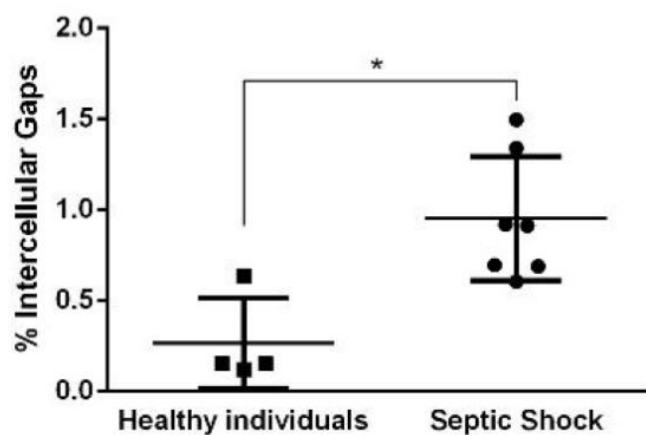
Methods: Serum was obtained from patients with septic shock (n=18) and healthy volunteers (n=11). EB function was assessed by electric cell-substrate impedance sensing, which measures the transendothelial electrical resistance (TEER) of endothelial cell monolayers, and by immunofluorescence-based studies of cell-cell junctions. Serum levels of VEGF-A and angiopoietin 2 (Ang-2) were also evaluated, to investigate the mechanisms of EB breakdown.

Results: Serum from patients with septic shock caused a stronger decrease in TEER than serum from healthy volunteers after 4h (21.52 ± 12.71 vs. 10.93 ± 10.69 ; $P=0.03$) and 6h (22.08 ± 13.24 vs. 12.32 ± 9.86 ; $P=0.04$) of incubation with HUVEC monolayers (Fig 1).



[Fig 1. Representative figure shows the effect of serum from two patients and two healthy individuals in endothelial barrier resistance.]

These functional alterations were associated with an increase in the extension of intercellular gaps ($0.265 \pm 0.247\%$ vs. $0.950 \pm 0.342\%$; $P=0.01$) (Fig 2).



[Fig 2. Extension of intercellular gaps was significantly higher in cells incubated with serum from septic shock patients (* $P = 0.01$).]

EB disruption could not be directly attributed to VEGF-A or Ang-2 in serum, since no correlation was observed between TEER and these proteins despite a marked increase of Ang-2 levels in serum from patients with septic shock ($14,391 \pm 4,192$ vs. $2,594 \pm 788$; $P < 0.0001$).

Conclusions: Our study provides direct evidence that serum from patients with septic shock is capable to induce functional and morphological changes associated with EB disruption, but that additional mechanisms other than VEGF-A and Ang-2 are associated with these changes. As EB regulation is increasingly regarded as a therapeutic target in sepsis, additional studies are warranted to identify the mechanisms associated with these findings.

Preferred Presentation Method: Oral or Poster

Apêndice 2. Publicação na revista *BMC Medicine*

Fiusa et al. *BMC Medicine* (2015) 13:105
DOI 10.1186/s12916-015-0327-2



OPINION

Open Access

Causes and consequences of coagulation activation in sepsis: an evolutionary medicine perspective

Maiara Marx Luz Fiusa¹, Marco Antonio Carvalho-Filho¹, Joyce M Annichino-Bizzacchi^{1,2} and Erich V De Paula^{1,2*}

Abstract

Background: Coagulation and innate immunity have been linked together for at least 450 million years of evolution. Sepsis, one of the world's leading causes of death, is probably the condition in which this evolutionary link is more evident. However, the biological and the clinical relevance of this association have only recently gained the attention of the scientific community.

Discussion: During sepsis, the host response to a pathogen is invariably associated with coagulation activation. For several years, coagulation activation has been solely regarded as a mechanism of tissue damage, a concept that led to several clinical trials of anticoagulant agents for sepsis. More recently, this paradigm has been challenged by the failure of these clinical trials, and by a growing bulk of evidence supporting the concept that coagulation activation is beneficial for pathogen clearance. In this article we discuss recent basic and clinical data that point to a more balanced view of the detrimental and beneficial consequences of coagulation activation in sepsis.

Summary: Reappraisal of the association between coagulation and immune activation from an evolutionary medicine perspective offers a unique opportunity to gain new insights about the pathogenesis of sepsis, paving the way to more successful approaches in both basic and clinical research in this field.

Background

Sepsis has been recently defined as a "life threatening condition that arises when a body's response to an infection injures its own tissues and organs" [1]. The last decades have witnessed continuous improvements in our understanding of the pathogenesis of this condition. Nonetheless, sepsis is still associated with mortality rates as high as 30% [2], and with a 10% annual increase in its incidence [2], it remains one of the biggest challenges of modern medicine [3].

The host response to an invading pathogen is one of the key determinants of patient outcome in sepsis [4]. This concept has been acknowledged for decades, based on the limitation of antibiotic therapy for sepsis treatment, and is supported by increasing knowledge about the cellular and molecular pathways involved in host: pathogen interaction [4,5]. Virtually all living beings have developed sensing mechanisms for rapid detection of invading pathogens,

which in humans are represented by pattern-recognition receptors (PRR). These receptors recognize conserved motifs in pathogens as well as danger signals that indicate cellular stress in sterile inflammatory conditions [6,7]. As expected, receptors and ligands of this sensing system have been under strong selective pressure during primate and hominid history [8,9], with pathogens regarded as key determinants of how these molecules evolved. An illustration of this concept is provided by the demonstration of convergent evolution of Toll-like receptor (TLR) genes in European and Roma (Gypsy) populations sharing the same geographic region. Similarities in TLR genes were found between these two distinct populations which were exposed to plague in Europe during the Middle Ages, when compared to people from northwest India, which is the geographic origin of the Roma population [10]. Because sepsis severity is mediated by the host response to a pathogen, it is not surprising that variations in these and other immune-related genes can influence sepsis severity [11].

However, the cellular processes activated by invading pathogens during sepsis are not restricted to classical immune-related genes, but also involve pathways less intuitively related to the immune system. Pathways that regulate

* Correspondence: erich@unicamp.br

¹Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-878 Campinas, SP, Brazil

²Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil



© 2015 Fiusa et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

endothelial barrier integrity and hemostasis (coagulation activation) are two important examples. The former facilitates access of leukocytes to tissues through diapedesis, contributing to pathogen clearance. In regard to the latter, discussing the proximate reasons of why coagulation is activated in sepsis, and the consequences thereof, are the two main objectives of this review. The importance of these two questions lies in the fact that the intensity and regulation of coagulation activation in sepsis seems to play a major role in the determination of patient outcome: be it pathogen clearance (and cure), or the development of secondary tissue damage such as disseminated intravascular coagulation (DIC) or multiple organ dysfunction [12].

In order to address these important questions from an evolutionary perspective, we will first discuss some of the potential selective pressures that molded the hemostatic system of modern humans. Next, we will confront the classical view about the role of coagulation activation during sepsis with emerging experimental data that could help us answer the important “why” question about the evolutionary reasons for coagulation activation during sepsis. Finally, we will discuss how the views that emerge from this discussion could influence research on sepsis.

Discussion

Selective pressures molding the hemostatic system

While pathogens are recognized as the main selective pressure on immune-related genes such as TLR and others [9,13], much less is known about the pressures that influenced the evolution of the hemostatic system. In humans, the ultimate goal of hemostasis is to keep blood from leaving the intravascular space through acquired breaches in endothelial lining. This is achieved by a finely regulated system capable of rapidly responding to the contact of tissue factor (TF), a protein that is normally segregated to the extravascular space, with coagulation factors present in plasma. This system is organized in a “cascade” fashion involving platelets, leukocytes, and pro- and anticoagulant proteins, that act in concert to promote the formation of clots that seal breaches in the vascular endothelium until tissue is repaired.

Biochemical and molecular evidence support the idea that the current organization of the human hemostatic system evolved more than 450 million years ago [14]. Although little information on the selective pressures that guided this evolution is available, one can speculate that increasing complexity of body plan organization may have been an important factor. Hemostatic systems in invertebrates such as the chelicerate horseshoe crab or in *Drosophila* are composed of much fewer genes and proteins than in vertebrates, but they present similarities that indicate a common origin of at least part of their components. For example, clot stability depends on the action of a transglutaminase that appears to contribute to clotting

in all invertebrates, and is homologous to human factor XIIIa [15]. In animals with more complex body plan organization, constraints on the diffusion of oxygen and other vital molecules, as well as compartmentalization of body functions in different organs, required the development of closed circulatory systems, with organ-specific adaptations of vascular bed anatomy and physiology. This complexity is based on significant heterogeneity of endothelial cell phenotype throughout the vascular tree [16,17] and is also associated with variations in hemostatic function between arteries and veins and even within venous and arterial beds. Organ-specific variations of hemostasis are well illustrated by clinical differences in the expression of thromboembolic diseases in different organs [18].

In addition to adaptations to increasingly complex circulatory systems, the close association between hemostasis and the innate immune response is another factor that influenced the evolution of the human hemostatic system. Evidence that hemostasis and inflammation evolved from a single-triggered mechanism can be traced back more than 450 million years, based on studies with the horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) [19]. Trauma to the exoskeleton is a major threat to these invertebrates that possess a rapid cell-based cascade-like response system, able to form an extracellular clot in the event of any breach to their integument. Since these ancient eukaryotes live around ocean waters, evolution selected a system triggered by minimum concentrations of bacterial endotoxin, present in Cyanobacteria (blue-green algae) for more than 2 billion years [20]. Interestingly, the extreme sensitivity of this system is the basis of the laboratory assay used to detect endotoxin contamination, which relies on proteins originated from these invertebrates. Horseshoe crabs do not possess a circulatory system, and the same endotoxin-triggered system protects these animals from both infection and loss of the internal milieu after injury. In humans, more complex and independent systems exist for the protection against pathogen invasion and bleeding. Nevertheless, the sharing of common initiators (such as endotoxin), as well as the overlap between several pathways, indicate the close association between the evolution of hemostasis and of the immune system during the last 450 million years.

Infectious diseases such as smallpox, bubonic plague, and malaria are recognized as important selective pressures acting upon the immune system genes in the last 10,000 to 20,000 years [8,21]. However, different selective pressures must have been relevant to innate immunity and hemostasis evolution in the remaining 2.5 million years of *Homo* evolution [22]. During this long period, much lower population densities and the nomadic habits of hunter-gatherers did not allow the same patterns of pathogen spread observed in post-agricultural societies, so that trauma, and not contagious infectious disease, was

the most important cause of death [21]. In line with these observations, a comprehensive necropsy program performed in a national park in Tanzania identified trauma, rather than infection, as the main cause of death among chimpanzees in the wild [23]. Similarly, predation-associated injuries were identified as a key selective pressure among anthropoid primates [24]. In an environment in which trauma caused by conflict or outdoor activities had to be dealt with without the aid of modern healthcare, a quick-responding and highly effective hemostatic system was most likely under a strong positive selection pressure. Moreover, in the absence of basic hygiene knowledge and antibiotics, it is easy to picture the importance of hemostasis as part of the innate immune system, whereby fibrin, platelet and leukocyte-rich clots contribute to avoid pathogen spread, as stated in the "hemostatic containment" hypothesis [25].

In this context, any trait that optimized hemostasis and wound repair without increasing the risk of thrombosis must have been beneficial in evolutionary terms. Given the very low prevalence of modern risk factors for thromboembolic diseases in ancient times, the trade-off equation between bleeding and thrombosis may have favored the development of an extraordinarily effective hemostatic system for ancient challenges, but one that, when exposed to modern stimuli such as high-fat diet, smoking, sedentarism, and ageing, contributes to the high prevalence of thromboembolic diseases [26]. The emergence and fixation of factor V Leiden in northern Europe about 30,000 years ago is a good illustration of this concept. Factor V Leiden is a genetic polymorphism that increases an individual's hemostatic capacity, resulting in less bleeding during delivery. However, when combined with the exogenous estrogen therapy present in oral contraceptives, it increases the incidence of venous thromboembolism [27]. The fact that these selective pressures on the hemostatic system operated for much longer periods than recent epidemics of plague and smallpox, maybe even before the divergence of humans from other great apes, may explain why modern tools used to detect selection signatures in our genome tend to identify the immune system, and not hemostasis, as a main target of natural selection. Accordingly, variations favoring a highly efficient hemostatic system may have been fixed in our genomes for millions of years, and may be less conspicuous to these statistical tools. Interestingly, *KNIG1*, the gene encoding kininogen, which is regarded as one of the main contacts between hemostasis and inflammation, was recently shown as a target of long-lasting selective pressure [28].

Classical view of the role of coagulation activation in sepsis

The recent market withdrawal of recombinant activated protein C (rhaPC), a natural anticoagulant used in the treatment of sepsis, represents the last chapter of a story characterized by serial failures of large-scale clinical trials

designed to test the generally accepted assumption that coagulation activation and microvascular thrombosis were major determinants of tissue damage in sepsis [29]. The earliest evidences about the role of coagulation activation during sepsis included histological demonstration of microvascular thrombosis in target organs of septic patients and the progressive decrease in platelet counts and coagulation factor levels in the late stages of sepsis, attributed to a "consumption coagulopathy". In the following years, the bulk of the experimental data indicated that sepsis was indeed associated with a shift in the hemostatic balance towards a procoagulant state. The most convincing data were: (i) the demonstration that tissue factor expression in circulating leukocytes can be stimulated by pathogens; (ii) an acquired deficiency of endogenous anticoagulant proteins such as antithrombin and protein C in sepsis patients; and (iii) a sustained increase in fibrinolysis inhibitors such as PAI-1, resulting in hypofibrinolysis [30]. Together, these data supported the concept that coagulation activation was at least in part responsible for the organ failure observed in sepsis. Manipulation of coagulation in animal models of sepsis provided further support to this concept, by showing that organ failure and even mortality could be limited by the blockade of discrete elements of hemostasis such as tissue factor [31] and factor VII [32], among others.

Based on this model, ambitious clinical development programs of recombinant natural anticoagulants (anti-thrombin, TFPI, and rhaPC) in patients with sepsis were launched, going all the way to phase 3 trials and, in one case, market approval. Unfortunately, the benefits of this strategy could not be confirmed in these trials, although additional clinical trials and meta-analysis are warranted before a definite conclusion on this issue can be reached [33]. Limitations of animal models [34] and in clinical trial design [29] have both been cited as potential explanations for the dissociation between preclinical and clinical data. We could also contribute to this discussion, by arguing for a more cautionary view of the long-standing assumption of a direct cause-and-effect relationship between coagulation activation and multi-organ failure in sepsis. In fact, the presence of microvascular thrombosis in target organs in sepsis was only demonstrated in studies with a limited number of patients, which did not consider the different phases of sepsis in their analysis [35,36]. More recent autopsy studies confirming these findings are restricted to very small case series of patients with fulminant sepsis [37,38]. In addition, although we do not argue against the presence of some degree of systemic hypercoagulability in sepsis, a concept supported by the recent demonstration of sepsis as an independent predictor of venous and arterial thrombosis [39,40], the presence of this phenomenon in the early stages of sepsis has been challenged by data generated using global

hemostasis tests, which pointed to a consistent down-regulation of thrombin generation in the early stages of sepsis [41,42]. In this context, a reappraisal of old and new data using an evolutionary medicine framework [43] can refine our understanding about the ultimate and proximate causes of hemostasis activation during sepsis.

Why is coagulation activated during sepsis?

The concept that coagulation activation can be beneficial during infections was suggested several years ago [20] and is gaining increasing support from high-quality data generated during the last decade. Excellent reviews about studies linking coagulation and innate immunity have been recently published [4,44,45]. Our goal here is to present an updated summary of these studies, highlighting their interpretation from an evolutionary medicine perspective.

Several studies suggest that coagulation proteins are necessary for eradication of invading pathogens. It is now known that tissue factor also triggers coagulation-independent signaling pathways mediated by protease activated receptors (PARs) on immune cells [46]. These PAR-dependent signals evoke pro- and anti-inflammatory pathways that regulate migration and proliferation of immune cells, angiogenesis, endothelial adhesion, and several other components of the host response to an infection [47,48]. PAR-dependent pathways are also activated by other components of hemostasis such as activated protein C, factor Xa, and thrombin [46], increasing the list of coagulation factors that regulate immune function.

The contact system, formerly known as the initiator of the intrinsic pathway of coagulation, is also involved in the host response to pathogens. Kininogen, one of the elements of the contact system, is now recognized as an important source of antimicrobial peptides released upon the recognition of several microorganisms by this protein [49]. Of note, a study looking for genomic signatures of positive selection has recently shown that kininogen has been under strong selective pressure during evolution [28]. Other components of hemostasis, such as coagulation factors II, X, and fibrinogen, have also been shown to release antimicrobial peptides, not necessarily involved with blood clotting (reviewed in [44]).

Another mechanism by which coagulation activation contributes to pathogen clearance is by forming a physical barrier that circumscribes infection foci, thereby facilitating pathogen clearance by immune cells. This "containment hypothesis" [25] is now supported by several lines of evidence indicating that down-regulation of different components of hemostasis (such as fibrin and platelets) hampers pathogen clearance (Table 1). A convincing demonstration that fibrin can be protective during infections comes from a study with fibrinogen-deficient mice, which presented increased mortality and enhanced bacterial growth in a model of *Listeria monocytogenes* infection. The role of fibrin

formation in the protective effect was confirmed by the reproduction of these results in mice treated with warfarin, an anticoagulant that down-regulates fibrin formation by an alternative mechanism [50]. A similar strategy confirmed the role of thrombin generation and fibrin formation in *Yersinia enterocolitica* infection [51]. Impaired pathogen clearance in fibrinogen-deficient mice was also suggested in a study using a group A streptococcal infection model [52]. Factor XIII, regarded as the most evolutionary conserved coagulation factor [53], also seems to be important for pathogen clearance, as suggested by an elegant study showing that *Streptococcus pyogenes* are immobilized and killed inside fibrin clots, in a factor XIII-dependent fashion [15].

The fibrinolytic system, which regulates hemostasis function by the degradation of fibrin thrombi when they are no longer necessary, also seems to be involved in pathogen clearance. It has been known for several years that sepsis is associated with impaired fibrinolysis, attributed to a brisk rise of a fibrinolysis inhibitor (PAI-1) in plasma [54,55]. While for several years this hypofibrinolytic state was viewed as one of the causes of microvascular thrombosis and tissue damage, an alternative explanation would be that by shutting down fibrinolysis, the host could limit the spread of invading pathogens by more resistant fibrin clots. Studies with genetically modified mice support the latter explanation. Accordingly, mice with tissue-type plasminogen activator deficiency, which results in impaired fibrinolysis, presented lower bacterial growth in the primary site of infection (lungs) in a murine model of Gram-negative sepsis [56]. In line with this observation, deficiencies of fibrinolysis inhibitors PAI-1 [57,58] and $\alpha 2$ -antiplasmin [59], both of which are associated with increased fibrinolytic activity, resulted in impairment of pathogen clearance in models of bacterial and viral infections. Another very significant evolutionary clue comes from the several examples of pathogen virulence factors based on proteases that degrade fibrin clots [60], of which streptokinase from *Streptococcus pyogenes* [61] and a plasminogen activator from *Yersinia pestis* are only the most famous examples [62,63].

Low platelet counts have long been recognized as an important prognostic factor in sepsis, based on the assumption that they were a biomarker of sepsis severity. In this regard, we recently demonstrated that platelet turnover, measured by the immature platelet fraction, correlates with sepsis severity [64]. However, recent studies indicate that platelets are in fact important players in host defense. Wong et al. demonstrated that platelets interact with Kupffer cells to encase blood-borne pathogens in the liver [65]. In another interesting study, antibody-induced thrombocytopenia resulted in impaired survival and in a proportional increase in bacterial growth in a model of pneumonia-derived sepsis [66]. The now widely recognized participation of neutrophil extracellular traps (NETs) in

Table 1 Effect of coagulation factor deficiencies in animal models of sepsis

Model (genetic alteration)	Effect on hemostasis*	Sepsis/infection model	Effect on pathogen clearance/sepsis severity
EPCR deficiency	↑	Pneumococcal sepsis	↓ bacterial dissemination [81]
		Meloidosis**	Unaltered [82]
		Endotoxemia	↑ mortality [83]
α2-antiplasmin deficiency	↓	Meloidosis**	↑ mortality, ↑ bacterial dissemination [59]
Overexpression of EPCR	↓	Pneumococcal sepsis	↑ bacterial dissemination [81]
		Meloidosis**	↑ bacterial dissemination [82]
t-PA deficiency	↑	Meloidosis**	↓ mortality, ↓ bacterial dissemination [56]
		Septic peritonitis	↑ mortality, ↑ bacterial dissemination [84]
Factor XI deficiency	↓	<i>Y. enterocolitica</i> (ip)	Unaltered [51]
		Peritoneal sepsis	↓ mortality [71]
		Listeriosis	↓ mortality, ↓ bacterial dissemination [70]
Factor VIII deficiency	↓	Endotoxemia	Unaltered [85]
		<i>E. coli</i> (ip)	↑ bacterial growth, ↔ survival [86]
Factor IX deficiency	↓	Endotoxemia	Unaltered [85]
PAI-1 deficiency	↓	Meloidosis**	↑ mortality, ↑ bacterial dissemination [57]
		<i>H. influenza</i> infection	↑ bacterial dissemination [58]
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	↑ mortality, ↑ bacterial dissemination [87]
Fibrinogen deficiency	↓	<i>Y. enterocolitica</i> (ip)	↑ mortality, ↑ bacterial dissemination [51]
		Group A streptococci	↑ mortality [52]
		Listeriosis	↑ mortality, ↑ bacterial dissemination [50]
Factor V deficiency	↓	Group A streptococci	↑ mortality [52]
Tissue factor deficiency	↓	<i>S. aureus</i> sepsis	Unaltered [72]
		<i>Y. enterocolitica</i> (ip)	↑ mortality [51]
		Endotoxemia	↓ inflammation [88]
		Endotoxemia	↓ mortality, ↓ inflammation [31]
PAI-1 + TAFI double deficiency	↓	<i>Y. enterocolitica</i> (ip)	↑ mortality [51]
Factor II deficiency	↓	<i>S. aureus</i> sepsis	↓ mortality [72]
Factor XIII deficiency	↓	<i>S. aureus</i> sepsis	Unaltered [72]
		<i>S. pyogenes</i> (skin)	↑ bacterial dissemination [15]
Protein C deficiency (het)	↑	Endotoxemia	↑ mortality [89]
TAFI deficiency	↓	<i>E. coli</i> (ip)	Transient ↑ bacterial outgrowth [90]
Factor VII deficiency	↓	Endotoxemia	↓ mortality, ↓ inflammation [32]
Factor V leiden	↑	Septic peritonitis	Unaltered [91]
		Endotoxemia	↓ mortality [76]***

*The global effect of each genetic deficiency on hemostasis was defined based on current knowledge about hemostatic mechanisms. **Respiratory sepsis by intranasal instillation of Gram-negative *Burkholderia pseudomallei*. ***Lower mortality observed only in heterozygous mice. EPCR: endothelial protein C receptor. t-PA: tissue-type plasminogen activator; PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1; TAFI: thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor; ip: intraperitoneal; het: heterozygous.

host defense [67,68] and the role of platelet activation in NET formation [69] provide another link between hemostasis and innate immunity [45].

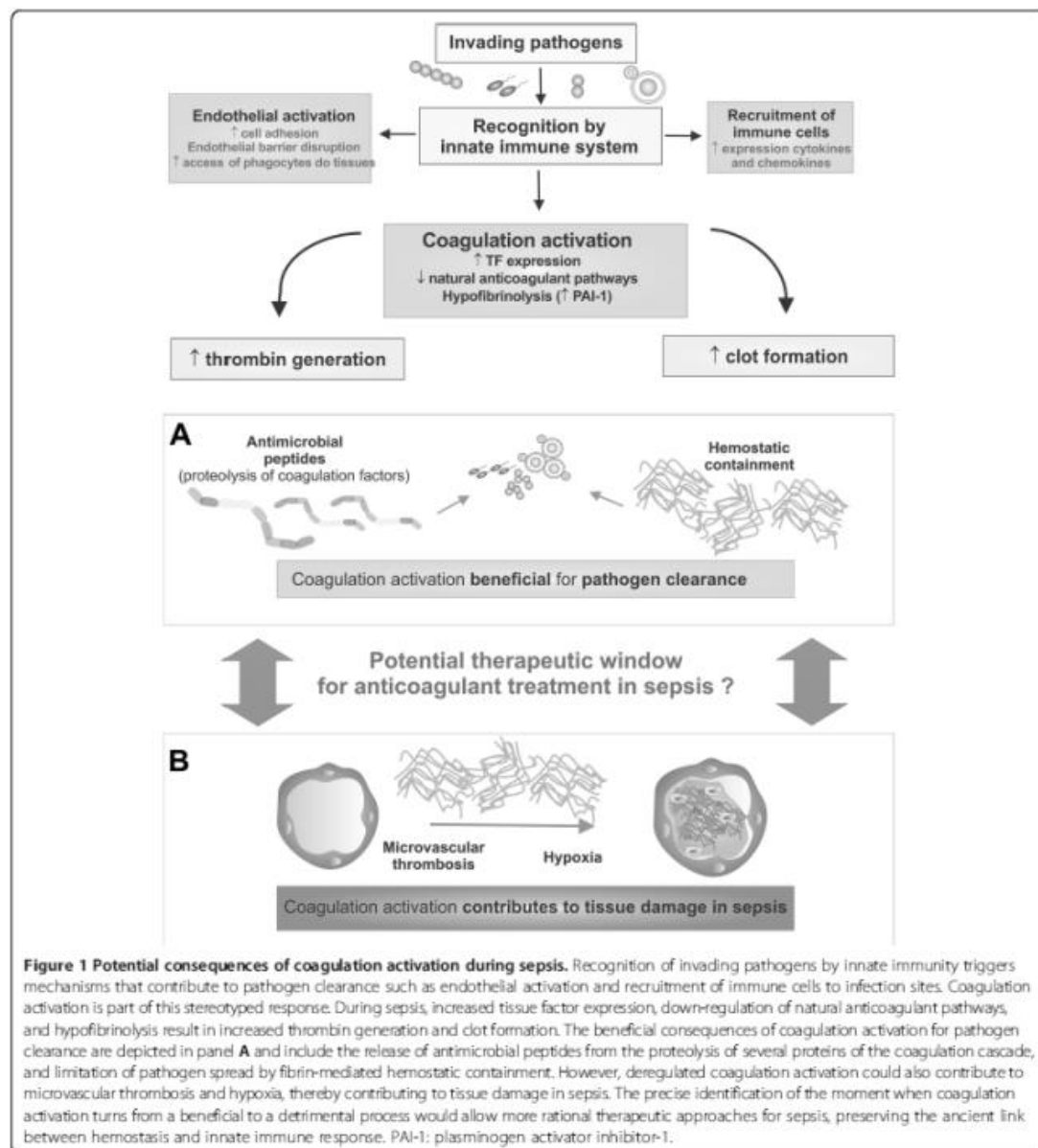
In spite of all these evidences, one should bear in mind the complexity of the interactions between hemostasis, innate immunity, and pathogens. For yet unknown reasons, factor XI deficiency in mice, which is also associated with reduced fibrin formation, has been consistently shown to

improve, rather than hamper, host response in different models of infection [70,71]. Survival advantage observed in studies with coagulation factor-deficient mice are not always consistently observed when different models of infection are used [72]. And in some settings, the so-called arms race between pathogen and host seems to have turned fibrin as an asset, rather than a limitation for some pathogens [72]. Indeed, this complexity is well illustrated

by the heterogenous effect of the down-regulation of thrombin generation/clot strength in sepsis outcome in different animal models (Table 1).

Clinical data also contributed to the idea that some level of coagulation activation could be beneficial to pathogen clearance, in that initial studies suggesting that coagulation inhibition could limit tissue damage during sepsis

were not confirmed in phase 3 clinical trials of anticoagulant agents for these patients [73-75]. The impact of factor V Leiden (FVL), a procoagulant variant of coagulation factor V, in sepsis mortality is also worth discussing. When analyzed in the population of a large phase 3 sepsis study, carriers of FVL presented as significantly lower 28-day mortality than non-carriers [76]. Although this data could not



be confirmed by other studies [27], the observation at least challenges the concept of a detrimental effect of coagulation activation during sepsis.

While the laboratory and clinical evidence presented so far point to a beneficial role of coagulation activation during sepsis, new evidence supporting the classical paradigm that coagulation activation can contribute to tissue damage in sepsis has also been published. *In vivo* microvascular imaging studies demonstrated disturbances of tissue perfusion in patients with sepsis, which could be reverted by the use of the anticoagulant activated protein C [77,78]. In addition, the negative results of randomized clinical trials of anticoagulant agents in sepsis have been challenged by recent systematic reviews and clinical trials [79,80], suggesting a beneficial effect of this treatment strategy in subgroups of patients with sepsis. If confirmed (in ongoing clinical trials and in larger meta-analysis [33]), these results point to the existence of a threshold above which coagulation activation becomes detrimental during sepsis.

Summary

Ultimate causes of coagulation activation in sepsis and implications for future research

Together, these data suggest that coagulation activation is an important component of the overall response against invading pathogens, and that eradication of invading pathogens could be considered the ultimate cause of coagulation activation during infection and sepsis. From this point of view, one can understand why several individual compartments of hemostasis are tuned towards the generation of increased amounts of thrombin during sepsis, based on the importance of fibrin and platelets in the host response to infection. The analysis of coagulation activation during sepsis from this evolutionary medicine perspective could also contribute to the explanation of why the use of systemic anticoagulants were not beneficial in large-scale trials in sepsis, highlighting the importance of identifying the precise moment at which coagulation activation turns from a beneficial to a detrimental process in sepsis (Figure 1). In this context, any targeted treatment for sepsis that limits coagulation activation should be tailored to preserve the function of a host defense mechanism that seems to have been around for at least 450 million years.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MMLF, MAC, JMA, and EVDP discussed all aspects of this review. EVDP drafted the manuscript. All authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

This study was financially supported by Fapesp and CNPq, Brazil. The Hematology and Hemotherapy Center, Hemocentro UNICAMP, forms part of the National Institute of Science and Technology of Blood, Brazil (INCT do Sangue CNPq/MCT/FAPESP).

Received: 5 November 2014 Accepted: 16 March 2015

Published online: 06 May 2015

References

- Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet*. 2013;381:774–5.
- Galeski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med*. 2013;41:1167–74.
- Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369:840–51.
- Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*. 2014;5:36–44.
- Salomao R, Brunialti MKC, Raposo MM, Baggio-Zappia GL, Galanos C, Freudenberg M. Bacterial sensing, cdi signaling, and modulation of the immune response during sepsis. *Shock*. 2012;38:227–42.
- Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:826–37.
- Hansen JD, Vojtech LN, Laing KJ. Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. *Dev Comp Immunol*. 2011;35:886–97.
- Barreiro LB, Quintana-Murci L. From evolutionary genetics to human immunology: how selection shapes host defence genes. *Nat Rev Genet*. 2010;11:17–30.
- Quach H, Wilson D, Laval G, Patin E, Manry J, Guibert J, et al. Different selective pressures shape the evolution of Toll-like receptors in human and African great ape populations. *Hum Mol Genet*. 2013;22:4829–40.
- Laayouni H, Oosting M, Luisi P, Ioana M, Aloriso S, Riechle-Ponze J, et al. Convergent evolution in European and Roma populations reveals pressure exerted by plague on Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:2668–73.
- Pino-Yanes M, Corrales A, Casula M, Blanco J, Muriel A, Espinosa E, et al. Common variants of TLR1 associate with organ dysfunction and sustained pro-inflammatory responses during sepsis. *PLoS One*. 2010;5:e13759.
- Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303:L355–63.
- Areal H, Abrantes J, Esteves PJ. Signatures of positive selection in Toll-like receptor (TLR) genes in mammals. *BMC Evol Biol*. 2011;11:368.
- Davidson CJ, Tuddenham EG, McVey JH. 450 million years of hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2003;3:1487–94.
- Loof TG, Mörgelin M, Johansson L, Oehmke S, Olin AI, Dickneite G, et al. Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense. *Blood*. 2011;118:2589–98.
- Monahan-Earley R, Dvorak AM, Aird WC. Evolutionary origins of the blood vascular system and endothelium. *J Thromb Haemost*. 2013;11:46–66.
- Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a006429.
- Rosenberg RD, Aird WC. Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states. *N Engl J Med*. 1999;340:1555–64.
- Opal SM, Esmon CT. Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care*. 2003;7:23–38.
- Opal SM. Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Crit Care Med*. 2000;28:S77–80.
- Diamond JM. Guns, germs, and steel: the fates of human societies. New York, NY, USA: W. W. Norton and Company; 1999. p. 496.
- Antón SC, Potts R, Aiello LC. Human evolution. Evolution of early Homo: an integrated biological perspective. *Science*. 2014;345:1236828.
- Terio KA, Kinsel MJ, Raphael J, Mlengeya T, Lipende I, Kirchoff CA, et al. Pathologic lesions in chimpanzees (*Pan troglodytes* *schweinfurthii*) from Gombe National Park, Tanzania, 2004–2010. *J Zoo Wildl Med*. 2011;42:597–607.
- Semple S, Cowlishaw G, Bennett PM. Immune system evolution among anthropoid primates: parasites, injuries and predators. *Proc Biol Sci*. 2002;269:1031–7.
- Alcock J, Brainard AH. Hemostatic containment – an evolutionary hypothesis of injury by innate immune cells. *Med Hypotheses*. 2008;71:960–8.
- Lee PY, Yun AJ, Bazar KA. Acute coronary syndromes and heart failure may reflect maladaptations of trauma physiology that was shaped during pre-modern evolution. *Med Hypotheses*. 2004;62:861–7.
- Van Mens TE, Levi M, Middeldorp S. Evolution of Factor V Leiden. *Thromb Haemost*. 2013;110:23–30.

28. Cagliani R, Forni D, Riva S, Pozzoli U, Colleoni M, Bresolin N, et al. Evolutionary analysis of the contact system indicates that kininogen evolved adaptively in mammals and in human populations. *Mol Biol Evol*. 2013;30:1397–408.
29. Opal SM, Dellinger RP, Vincent JL, Masur H, Angus DC. The next generation of sepsis clinical trial designs: what is next after the demise of recombinant human activated protein C? *Crit Care Med*. 2014;42:1714–21.
30. Levi M, Keller TT, van Gorp E, ten Cate H. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res*. 2003;60:26–39.
31. Pawlinski R, Pedersen B, Schabbauser G, Tencati M, Holscher T, Bolsvert W, et al. Role of tissue factor and protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood*. 2004;103:1342–7.
32. Xu H, Ploplis VA, Castellino FJ. A coagulation factor VII deficiency protects against acute inflammatory responses in mice. *J Pathol*. 2006;210:488–96.
33. Jiang L, Jiang S, Feng X, Ma Y, Zhang M. The efficacy and safety of different anticoagulants on patients with severe sepsis and derangement of coagulation: a protocol for network meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open*. 2014;4:e006770.
34. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:3507–12.
35. Shimamura K, Oka K, Nakazawa M, Kojima M. Distribution patterns of microthrombi in disseminated intravascular coagulation. *Arch Pathol Lab Med*. 1983;107:543–7.
36. Kojima M, Shimamura K, Mori N, Oka K, Nakazawa M. A histological study on microthrombi in autopsy cases of DIC. *Bibl Haematol*. 1983;49:95–106.
37. Tajiri T, Tate G, Masunaga A, Miura K, Masuda S, Kunimura T, et al. Autopsy cases of fulminant bacterial infection in adults: clinical onset depends on the virulence of bacteria and patient immune status. *J Infect Chemother*. 2012;18:637–45.
38. Tajiri T, Tate G, Enosawa T, Akita H, Ohike N, Masunaga A, et al. Clinicopathological findings in fulminant-type pneumococcal infection: report of three autopsy cases. *Pathol Int*. 2007;57:606–12.
39. Donzé JD, Ridker PM, Finlayson SRG, Bates DW. Impact of sepsis on risk of postoperative arterial and venous thromboses: large prospective cohort study. *BMJ*. 2014;349:g5334.
40. Ribeiro DD, Ijfering WM, Van Hylckama VA, Rosendaal FR, Cannegieter SC. Pneumonia and risk of venous thrombosis: results from the MEGA study. *J Thromb Haemost*. 2012;12:1179–82.
41. Piccoli-Quaino SK, Alves BE, Fialto VB, Montalvo SAL, De Souza CA, Amichino-Bizzacchi JM, et al. Impairment of thrombin generation in the early phases of the host response of sepsis. *J Crit Care*. 2014;29:31–6.
42. Masson PB, Peters P, Ledoux D, Zimmermann V, Canivet J-L, Masson PP, et al. Persistent hypocoagulability in patients with septic shock predicts greater hospital mortality: impact of impaired thrombin generation. *Intensive Care Med*. 2012;38:1326–35.
43. Brüne M, Hochberg Z. Evolutionary medicine - the quest for a better understanding of health, disease and prevention. *BMC Med*. 2013;11:116.
44. Van der Poll T, Herwaldt H. The coagulation system and its function in early immune defense. *Thromb Haemost*. 2014;112:640–8.
45. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:34–45.
46. Ruf W. Protease-activated receptor signaling in the regulation of inflammation. *Crit Care Med*. 2004;32:287–92.
47. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1800–14.
48. Mackman N. The many faces of tissue factor. *J Thromb Haemost*. 2009;9:136–9.
49. Nickel KF, Renné T. Crosstalk of the plasma contact system with bacteria. *Thromb Res*. 2012;130 Suppl 5:78–83.
50. Mullick IK, Szaba FM, Berggren KN, Parent MA, Kummer LW, Chen W, et al. Infection-stimulated fibrin deposition controls hemorrhage and limits hepatic bacterial growth during listeriosis. *Infect Immun*. 2005;73:3888–95.
51. Luo D, Szaba FM, Kummer LW, Plow EF, Mackman N, Gallani D, et al. Protective roles for fibrin, tissue factor, plasminogen activator inhibitor-1, and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, but not factor XI, during defense against the gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. *J Immunol*. 2011;187:1866–76.
52. Sun H, Wang X, Degen JL, Ginsburg D. Reduced thrombin generation increases host susceptibility to group A streptococcal infection. *Blood*. 2009;113:358–64.
53. Loof TG, Schmidt O, Herwaldt H, Theopold U. Coagulation systems of invertebrates and vertebrates and their roles in innate immunity: the same side of two coins? *J Innate Immun*. 2011;3:34–40.
54. Van Deventer SJ, Büller HR, ten Cate JW, Aarden LA, Hack CE, Sturk A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood*. 1990;76:2520–6.
55. Blemond BJ, Levi M, Ten Cate H, Van der Poll T, Büller HR, Hack CE, et al. Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 release during experimental endotoxaemia in chimpanzees: effect of interventions in the cytokine and coagulation cascades. *Clin Sci (Lond)*. 1995;88:587–94.
56. Kager LM, Wiersinga WJ, Roelofs JTH, Meijers JCM, Levi M, Van't Veer C, et al. Endogenous tissue-type plasminogen activator impairs host defense during severe experimental Gram-negative sepsis (meloidosis)*. *Crit Care Med*. 2012;40:2168–75.
57. Kager LM, Wiersinga WJ, Roelofs JTH, Meijers JCM, Levi M, Van't Veer C, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 contributes to protective immunity during experimental Gram-negative sepsis (meloidosis). *J Thromb Haemost*. 2011;9:2020–8.
58. Lim JH, Woo CH, Li J-D. Critical role of type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in early host defense against nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;414:67–72.
59. Kager LM, Weehuizen TA, Wiersinga WJ, Roelofs JTH, Meijers JCM, Dondorp AM, et al. Endogenous α 2-antiplasmin is protective during severe gram-negative sepsis (meloidosis). *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188:967–75.
60. Bergmann S, Hammerschmidt S. Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost*. 2007;98:512–20.
61. Loof TG, Deicke C, Medina E. The role of coagulation/fibrinolysis during *Streptococcus pyogenes* infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:128.
62. Lathem WW, Price PA, Miller VL, Goldman WE. A plasminogen-activating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague. *Science*. 2007;315:509–13.
63. Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen JD. A surface protease and the invasive character of plague. *Science*. 1992;258:1004–7.
64. Enz Hubert RM, Rodrigues MV, Andreguetto BD, Santos TM, de Fátima Pereira Gilberti M, de Castro V, et al. Association of the immature platelet fraction with sepsis diagnosis and severity. *Soc Rep*. 2015;5:8019.
65. Wong CHY, Jenne CN, Petri B, Chrobok NL, Kubus P. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat Immunol*. 2013;14:785–92.
66. De Stoppelaar SF, van't Veer C, Claushuis TAM, Albersen BJA, Roelofs JTH, van der Poll T. Thrombocytopenia impairs host defense in gram-negative pneumonia derived sepsis. *Blood*. 2014;124:3781–90.
67. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*. 2013;122:268–76.
68. Yipp BG, Kubus P. NETosis: how vital is it? *Blood*. 2013;122:2784–94.
69. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007;13:463–9.
70. Luo D, Szaba FM, Kummer LW, Johnson LL, Tucker EI, Gruber A, et al. Factor XI-deficient mice display reduced inflammation, coagulopathy, and bacterial growth during listeriosis. *Infect Immun*. 2012;80:91–9.
71. Tucker EI, Gallani D, Hurst S, Cheng Q, Hanson SR, Gruber A. Survival advantage of coagulation factor XI-deficient mice during peritoneal sepsis. *J Infect Dis*. 2008;198:271–4.
72. Flick MJ, Du X, Prasad JM, Raghu H, Palumbo JS, Smeds E. Genetic elimination of the binding motif on fibrinogen for the *S. aureus* virulence factor ClfA improves host survival in septicemia. *Blood*. 2013;121:1783–94.
73. Abraham E, Reinhart K, Opal S, Demeyer I, Dolg C, Rodriguez AL, et al. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003;290:238–47.
74. Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2001;286:1869–78.
75. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut J-F, Douglas IS, Finfer S, et al. Drotrecogin α (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med*. 2012;366:2055–64.
76. Kerlin BA, Yan SB, Isermann BH, Brandt JT, Sood R, Basson BR, et al. Survival advantage associated with heterozygous factor V Leiden mutation in patients with severe sepsis and in mouse endotoxemia. *Blood*. 2003;102:3085–92.
77. De Backer D, Verdant C, Chierego M, Koch M, Guillo A, Vincent J-L. Effects of drotrecogin α (activated) on microcirculatory alterations in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2006;34:1918–24.
78. Donati A, Damiani E, Botticelli L, Adrario E, Lombardo MR, Domizi R, et al. The aPC treatment improves microcirculation in severe sepsis/septic shock syndrome. *BMC Anesthesiol*. 2013;13:25.

79. Kalil AC, LaRosa SP. Effectiveness and safety of drotrecogin alfa (activated) for severe sepsis: a meta-analysis and metaregression. *Lancet Infect Dis*. 2012;12:678–86.
80. Iba T, Saitoh D, Wada H, Asakura H. Efficacy and bleeding risk of antithrombin supplementation in septic disseminated intravascular coagulation: a secondary survey. *Crit Care*. 2014;18:497.
81. Schouten M, de Boer JD, Kager LM, Roelofs JJTH, Meijers JCM, Esmon CT, et al. The endothelial protein C receptor impairs the antibacterial response in murine pneumococcal pneumonia and sepsis. *Thromb Haemost*. 2014;111:970–80.
82. Kager LM, Schouten M, Wiersinga WJ, de Boer JD, Lattenist LCW, Roelofs JJTH, et al. Overexpression of the endothelial protein C receptor is detrimental during pneumonia-derived gram-negative sepsis (Melioidosis). *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:e2306.
83. Zheng X, Li W, Song Y, Hu Y, Ferrell GL, Esmon NL, et al. Non-hematopoietic EPCR regulates the coagulation and inflammatory responses during endotoxemia. *J Thromb Haemost*. 2007;5:394–400.
84. Rendkens R, Roelofs JJTH, Florquin S, de Vos AF, Pater JM, Lijnen HR, et al. Endogenous tissue-type plasminogen activator is protective during *Escherichia coli*-induced abdominal sepsis in mice. *J Immunol*. 2006;177:1189–96.
85. Vancine SMC, Picoli-Quaino SK, Costa DSP, Montalvão SAL, Ozelo MC, Annichino-Bizzacchi JM, et al. Evaluation of the host response to endotoxemia of FVIII and FIX deficient mice. *Haemophilia*. 2011;17:800–7.
86. Schoenmakers SHHF, Brüggemann LW, Groot AP, Majis S, Reitsma PH, Spek CA. Role of coagulation FVIII in septic peritonitis assessed in hemophilic mice. *J Thromb Haemost*. 2005;3:2738–44.
87. Rendkens R, Roelofs JJTH, Bonta PI, Florquin S, de Vries CJM, Levi M, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 is protective during severe Gram-negative pneumonia. *Blood*. 2007;109:593–601.
88. Schoenmakers SHHF, Versteeg HH, Groot AP, Reitsma PH, Spek CA. Tissue factor haploinsufficiency during endotoxin induced coagulation and inflammation in mice. *J Thromb Haemost*. 2004;2:2185–93.
89. Levi M, Dörffler-Melly J, Reitsma P, Buller H, Florquin S, van der Poll T, et al. Aggravation of endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation and cytokine activation in heterozygous protein-C-deficient mice. *Blood*. 2003;101:4823–7.
90. Rendkens R, Roelofs JJTH, ter Horst SAJ, van't Veer C, Havik SR, Florquin S, et al. Absence of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor protects against sepsis-induced liver injury in mice. *J Immunol*. 2005;175:6764–71.
91. Brüggemann LW, Schoenmakers SHHF, Groot AP, Reitsma PH, Spek CA. Role of the factor V Leiden mutation in septic peritonitis assessed in factor V Leiden transgenic mice. *Crit Care Med*. 2006;34:2201–6.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Apêndice 3. Outras publicações com participação da aluna durante o doutorado

FERREIRA, F. L. B., COLELLA, M. P., MEDINA, S. S., COSTA-LIMA, C., **FIUSA, M. M. L.**, COSTA, L. N. G., DE PAULA, E. V. Evaluation of the immature platelet fraction contribute to the differential diagnosis of hereditary, immune and other acquired thrombocytopenias. *Scientific Reports*.v.7, p.3355, 2017.

DE SOUZA, GLEICE REGINA; HOUNKPE, BIDOSSESSI WILFRIED; **FIUSA, M M L**; COLELLA, MARINA PEREIRA; Annichino-Bizzacchi JM; TRAINA, FABIOLA; COSTA, FERNANDO FERREIRA; DE PAULA, ERICH VINICIUS. Tissue factor-dependent coagulation activation by heme: A thromboelastometry study. *PLoS One*.v.12, p.e0176505 - , 2017.

HOUNKPE, BIDOSSESSI WILFRIED; **FIUSA, M M L**; COLELLA, MARINA PEREIRA; NILKENES GOMES DA COSTA, LOREDANA; BENATTI, RAFAELA DE OLIVEIRA; OLALLA SAAD, SARA T; Costa, Fernando Ferreira; DOS SANTOS, MAGNUN NUELDO NUNES; DE PAULA, E. V. Role of innate immunity-triggered pathways in the pathogenesis of Sickle Cell Disease: a meta-analysis of gene expression studies. *Scientific Reports*.v.5, p.17822 - , 2015.

9. ANEXOS

Anexo 1- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FCM/Unicamp



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 13/02/12
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1261/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 1165.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES EM PROTEÍNAS DAS JUNÇÕES DO TIPO ADHERENS DURANTE A SEPSE EM CULTURAS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gleice Regina de Souza

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 02/12/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 13/02/13 (O formulário encontra-se no site acima).

II – OBJETIVOS.

Explorar a interação da VE-caderina e da p120catenina na fisiopatologia do choque séptico, em ensaio *in vitro* realizado a partir de plasma de pacientes com diagnóstico de choque séptico.

III – SUMÁRIO.

O estudo pretende utilizar o plasma de pacientes em cultivo de células endoteliais e verificar os possíveis efeitos sobre a permeabilidade celular. O ensaio biológico empregará plasma de 12 a 24 sujeitos com diagnóstico clínico-laboratorial de sepse e choque séptico e a linhagem celular HMVEC, através do sistema "transwell-COL". Os dados serão comparados com grupo controle, composto por 10 sujeitos saudáveis. A análise estatística será feita pelos testes Mann-Whitney e Wilcoxon. Os autores estipularam 8 trimestres para o estudo, a partir de março de 2012, e o projeto conta com apoio financeiro da FAPESP e CNPq. Há previsão de armazenamento do material biológico e de consulta a este CEP, quando novos projetos empregarem o mesmo material.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

 www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de dezembro de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



CEP, 27/06/17.
(PARECER CEP: Nº 1261/2011)

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES EM PROTEÍNAS DAS JUNÇÕES DO TIPO ADHERENS DURANTE A SEPSE EM CULTURAS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS”.

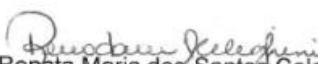
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gleice Regina de Souza

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) aprovou a emenda que inclui a aluna Maiara Marx Luz Fiusa como membro na equipe de pesquisa e a mesma irá utilizar os dados do referido projeto em seu doutorado, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/UNICAMP, em 27 de junho de 2017.


Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP